

**Strukturaufklärung neuer Flavonglykoside
aus *Cirsium oleraceum* Scop.
und *Trifolium campestre* Schreb.**

Werner Kirdner

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554020_0093

Strukturaufklärung neuer Flavonglykoside aus Cirsium oleraceum
Scop. und Trifolium campestre Schreb.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Werner Kirchner

aus

Stuttgart

Juni 1960



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 7. 1960

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung

B. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Untersuchungen	2
II. Glykosid A und B aus <i>Cirsium oleraceum</i>	2
1. Isolierung	2
2. Papierchromatographisches Verhalten	3
3. Chemische Untersuchungen von Glykosid A	5
4. Physikalische Untersuchungen von Glykosid A	13
5. Chemische Untersuchungen von Glykosid B	18
6. Physikalische Untersuchungen von Glykosid B	22
7. Zusammenfassung	25
III. Glykosid C aus <i>Trifolium campestre</i>	25
1. Isolierung	26
2. Vergleichende Untersuchungen	26
IV. Isolierung von Linarin und Pectolinarin aus <i>Linaria vulgaris</i> ..	32
V. Über das Vorkommen von Linarin und Pectolinarin im Pflanzenreich	33

C. Experimenteller Teil

1. Isolierungsverfahren an der Polyamidsäule	37
a) Isolierung von Glykosid A und B aus <i>Cirsium oleraceum</i> (Compositae)	37
b) Isolierung von Glykosid C aus <i>Trifolium campestre</i> (Papilionaceae)	38
c) Isolierung von Linarin und Pectolinarin aus <i>Linaria vulgaris</i> ..	40
2. Papierchromatographische Untersuchungen	40
a) R _f -Werte	40
b) Fluoreszenzfarben im UV-Licht	41
3. Chemische Untersuchungen	42
a) Farbreaktionen	42
b) Darstellung der Aglukone	44
c) Zuckeranteil	45
d) CH- und CH ₃ O-Bestimmungen	46
e) Entmethylierung	49
f) Methylierung	50

	Seite
g) Azetylierung	52
h) Alkalispaltung	52
4. Physikalische Untersuchungen	55
a) UV-Spektroskopie	55
b) IR-Spektroskopie	57

A. Einleitung

Nach unseren bisherigen systematischen Untersuchungen sind vor allem die Pflanzen der artenreichen Kompositen- und Papilionaceen-Familie im Aufbau von Flavonoiden durch eine grosse Variabilität gekennzeichnet.

Für die Papilionaceen ist das Auftreten von Isoflavonen bemerkenswert, während aus Kompositen vorwiegend Polyhydroxy- und mehrfach methylierte Flavone isoliert wurden.

In Fortsetzung der von W. KIRMAYER¹ und H. GRASMAIER² begonnenen Arbeiten sollten einige Flavone, die von den genannten Autoren nur unvollkommen untersucht werden konnten, nunmehr strukturell aufgeklärt werden.

Ein Zusammenhang zwischen den Arbeiten von W. KIRMAYER¹ und H. GRASMAIER² ergab sich insofern, als zwei von W. KIRMAYER und H. GRASMAIER zur gleichen Zeit, aber aus verschiedenen Pflanzenfamilien isolierte Verbindungen ähnliche Strukturen vermuten liessen.

1) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

2) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

B. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Untersuchungen

Bei der Isolierung von Flavonen aus *Trifolium campestre* fand H. GRASMAIER³ eine Verbindung, die er auf Grund der CH- und OCH₃-Bestimmungen für ein Trimethoxy-Flavonglykosid hielt. Als Zuckeranteil stellte er Glukose und Rhamnose fest. Ausserdem machten die IR-spektroskopischen Untersuchungsergebnisse eine Estergruppierung im Zuckeranteil wahrscheinlich.

Zu gleicher Zeit erhielt W. KIRMAYER⁴ aus *Cirsium oleraceum* ein Mischkristallisat, dessen eine Substanz den gleichen R_f-Wert hatte, wie die von H. GRASMAIER³ isolierte Verbindung. Ob es sich bei dieser Substanz um ein Flavon bzw. ein Flavonglykosid handelte, blieb ungeklärt, da die Verbindung im Gegensatz zur zweiten Verbindung des Mischkristallisates auf die üblichen Flavonsprühteste nicht ansprach.

W. KIRMAYER⁴ vermutete, dass es sich um Glykoside handelte, da beide Substanzen gegen Säure labil waren, nach der Hydrolyse Glukose und Rhamnose lieferten und ausserdem auf dem Chromatogramm zwei neue Flecke mit anderen R_f-Werten entstanden waren, die im gleichen Verhältnis zu einander standen, wie die Ausgangsverbindungen.

II. Glykosid A und B aus *Cirsium oleraceum*

1. Isolierung

Zunächst wurde von uns die Bearbeitung der Blätter von *Cirsium oleraceum* in Angriff genommen.

Die Blätter von *Cirsium oleraceum* wurden nach dem Trocknen zerkleinert und im Soxhletapparat mit Methanol mehrere Tage lang extrahiert.

Es fiel ein graugrüner grobkristalliner Niederschlag aus, den wir abfiltrierten, trockneten, in eine Papierhülse gaben und im Soxhletapparat durch Chloroformextraktion vom Chlorophyll befreiten.

Das auf diese Weise vorgereinigte Rohkristallisat zeigte auf dem Papierchromatogramm unter dem UV-Licht im Laufmittel Isopropanol-Ameisensäure-Wasser *) (2+5+5), die beiden erwähnten Substanzen - im folgenden Glykosid A und B ge-

3) H. GRASMAIER, Dissertation München, Juli 1959

4) W. KIRMAYER, Dissertation München, März 1959

*) im folgenden mit IAW abgekürzt.

nannt - als zwei braune Flecke. Im Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser (5+1+4)*) ergab sich keine Auftrennung der beiden Flecke.

Glykosid A und B waren sich in ihren Löslichkeitsverhältnissen so ähnlich, dass die üblichen Trennverfahren der Ausschüttelung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln von vorneherein ausschieden.

Auch die fraktionierte Kristallisation brachte keinen Erfolg. Aus den verschiedenen Lösungsmitteln kristallisierte immer das Mischkristallisat aus.

Wir wandten uns deshalb der Säulen-Chromatographie zu. Aluminiumoxyd, Magnesiumtrisilikat und Zellulose als Adsorbentien, führten auch unter Variation der Lösungsmittelsysteme zu keinen befriedigenden Ergebnissen. In keinem Fall konnte eine reine Fraktion erhalten werden. Erst die Anwendung des vor kurzem zur präparativen Auftrennung benutzten, und von uns zur Trennung von Flavonen eingeführten Polyamids, führte zu einer Auftrennung der beiden Substanzen, wenn mit Methanol eluiert wurde.

Die aufgefangenen Fraktionen aus der Polyamidsäule wiesen in der ersten Fraktion einen Gehalt an Glykosid A auf. Es folgten Mischfraktionen mit Glykosid A und B, während der Nachlauf nur noch Glykosid B enthielt.

Da die beiden Substanzen rasch von der Polyamidsäule eluierbar waren, konnte die gleiche Säule hintereinander für zwei weitere Isolierungsgänge verwendet werden.

Das Beschicken der Polyamidsäule mit der methanolischen Lösung des Mischkristallisates in Abständen erwies sich technisch als sehr vorteilhaft, da es Zeit und Polyamidpulver sparte.

Nach dem Einengen der vereinigten Fraktionen und Umkristallisieren der Niederschläge aus Methanol erhielten wir Glykosid A in Form hellgelber, sternförmiger Kristalle vom Smp. 275° und Glykosid B in kleinen weissen Nadeln vom Smp. 268-270°.

2. Papierchromatographisches Verhalten

Glykosid A bildete keinerlei Fluoreszenzfarben unter dem UV-Licht aus.

Glykosid B zeigte nach dem Besprühen des Chromatogrammes mit Aluminiumsulfatlösung⁵ und basischer Bleiazetatlösung^{5, 6, 7, 8, 9} eine Gelbfärbung unter dem UV-Licht.

*) im folgenden mit BEW abgekürzt.

5) R. HÄNSEL in H. F. LINSKENS "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959 S. 234

Auf Grund der R_f -Werte von Glykosid A und B in IAW^{8,10} und in BEW^{5,11,12} musste es sich um Flavone handeln, die entweder nur wenige freie Hydroxylgruppen besaßen oder deren Hydroxylgruppen alle oder zum grössten Teil mit Methoxylgruppen besetzt oder mit Zucker verglykosidiert waren.

Das Ausbleiben jeglicher Farbreaktionen unter dem UV-Licht bei Glykosid A liess es zunächst zweifelhaft erscheinen, ob es sich überhaupt um ein Flavonglykosid handelte. Es gibt jedoch auch einzelne Flavone, wie z.B. das 5.6.7.4'-Tetrahydroxy-Flavon (Scutellarein), das auf dem Papierchromatogramm nach dem Besprühen mit Aluminiumsulfat- und basischer Bleiazetatlösung ebenfalls keine Fluoreszenzfarben unter dem UV-Licht zeigt.

Das sehr ähnliche Verhalten von Glykosid A und Glykosid B im Isolierungsgang, in ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und in ihrer Adsorptionsfähigkeit an Polyamid deuteten jedoch auf eine Flavonstruktur hin.

Wenn Glykosid A ein Flavon ist, so könnte man auf Grund seines papierchromatographischen Verhaltens folgende Aussagen machen: Eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3 und eine ortho-Gruppierung freier Hydroxylgruppen im Seitenphenyl sind nicht vorhanden. Die Hydroxylgruppen sind veräthert, verglykosidiert oder fehlen völlig.

Die braune Fluoreszenz von Glykosid B unter dem UV-Licht deutete darauf hin, dass keine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3 vorhanden war¹³. Das Auftreten eines gelben Blei- und Aluminiumkomplexes nach dem Besprühen mit basischer Bleiazetat- und Aluminiumsulfatlösung liess jedoch eine solche am C-Atom 5 erwarten.

Eine Orthogruppierung freier Hydroxylgruppen war nach den Untersuchungsergebnissen von W. KIRMAYER¹³ nicht zu erwarten, so dass mit einer Monosubstitution im Seitenphenyl zu rechnen war. Das papierchromatographische Verhalten deutete somit auf ein Flavonglykosid mit wenigen Hydroxylgruppen hin, wovon sich die eine im Chromongerüst, und zwar sehr wahrscheinlich in C₅-Stellung und die andere im Seitenphenyl, vermutlich am C_{3'} oder C_{4'} befinden könnte.

-
- 6) T. B. GAGE, C. D. DOUGLASS, S. H. WENDER, *Analyt. Chem.* **23**, 1582 (1951)
 - 7) T. A. GEISSMAN in K. PAECH u. M. V. TRACEY "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg Bd. III S. 468 (1959)
 - 8) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959
 - 9) T. RAO, T. A. SESHADRI, *Proc. Indian Acad. Sci.* **171**, 119 (1943)
 - 10) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, H. GOETZ, *Arch. Pharm. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* **291/63**, 44 (1959)
 - 11) E. C. BATE-SMITH, R. G. WESTALL, *Biochim. biophysica Acta* **4**, 427 (1950)
 - 12) R. PARIS, *Bull. Soc. Chim. biol.* **34**, 767 (1952)
 - 13) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

3. Chemische Untersuchungen von Glykosid A

Zunächst untersuchten wir Glykosid A. Nachdem die Farbreaktionen auf dem Papier keine Hinweise zur chemischen Klassifizierung brachten, führte uns das Ergebnis des positiven Reduktionstestes¹⁴ in Zink-Salzsäure zu der Aussage, dass Glykosid A in die Gruppe der Flavone einzuordnen war. Der Isolierungsgang¹⁵ und die gute Trennmöglichkeit über Polyamidsäulen^{16,17} wiesen gleichfalls darauf hin.

Die Molisch-Reaktion mit α -Naphthol war bei Glykosid A positiv, wodurch die Vermutung W. KIRMA YERS¹⁸, dass es sich in beiden Fällen um Glykoside handle, bestätigt wurde.

Mit Eisenchloridlösung zeigte Glykosid A eine Braunfärbung, die nach Zugabe von zwei Tropfen Salzsäure in Grün umschlug und beim Neutralisieren mit Natriumacetat wieder erschien. Nach L. H. BRIGGS und R. H. LOCKER¹⁹ deutet diese Farbreaktion auf eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 hin.

Der Zirkonoxychlorid-Zitronensäure-Sprühtest²⁰ war negativ, so dass eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3 auszuschliessen und eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 zu vermuten war.

Die Säurehydrolyse mit Schwefelsäure ergab ein Aglukon mit einem Smp. von 220-223°, dessen Molisch-Reaktion negativ war. Der papierchromatographische Nachweis von Zuckern bestätigte erneut die Glykosidstruktur von Glykosid A.

In ihren Farbreaktionen auf dem Papierchromatogramm und mit Eisenchlorid²¹ unterschieden sich Glykosid und Aglukon A nicht. Damit entfiel auch die Möglichkeit einer Verglykosidierung am C-Atom 3. Glykosid A ist demnach kein Flavonol.

14) R. WILLSTÄTTER, H. MALLISON, S. B. preuss. Akad. Wiss. phys. math. Kl. 768 (1914)

15) R. HÄNSEL in H. F. LINSKENS "Papierchromatographie in der Botanik" Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959 S. 228

16) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, W. LEEB, Naturwiss. 44, 513 (1957)

17) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, Pharm. Z. 104, 738 (1959)

18) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

19) L. H. BRIGGS, R. H. LOCKER, J. Chem. Soc. London 3131 (1951)

20) L. HÖRHAMMER, R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 294/56, 276 (1951)

21) L. H. BRIGGS, R. H. LOCKER, J. Chem. Soc. London 3131 (1951)

Den Zuckeranteil identifizierten wir als Glukose und Rhamnose, und zwar papierchromatographisch mit Hilfe von Testsubstanzen anhand desselben R_f -Wertes, Vergärung der Glukose mit Presshefe und Darstellung des Rhamnosazons.

Die quantitative saure Hydrolyse ergab eine Ausbeute von 51.2% Aglukon und damit einen Zuckeranteil von 48.8%. Dies entsprach zwei Zuckermolekülen in Glykosid A. Daraus ergab sich die Struktur eines Diglykosides.

Die Zucker konnten nun einzeln mit je einer Hydroxylgruppe des Flavonkernes verknüpft oder auch in Form eines Disaccharides nur mit einer Hydroxylgruppe des Flavons verglykosidiert sein.

Zur Klärung der Substitutionsverhältnisse im Molekül wurden CH - und CH_3O - Bestimmungen durchgeführt. Die Methoxylgruppenbestimmung mit 10.52% CH_3O für das Glykosid und 24.46% für das Aglukon bestätigte das Vorliegen eines Polymethoxy-Flavons. Auf Grund der Eisenchloridreaktion musste jedoch noch zusätzlich eine freie Hydroxylgruppe vorhanden sein.

Die mikroanalytischen CH -Bestimmungen ergaben für Glykosid A 55.65% C und 5.44% H und für Aglukon A 64.61% C und 4.74% H. Anhand der Berechnung des Molekulargewichtes einer Verbindung aus dem CH -Wert mit Hilfe der Logarithmischen Rechentafel²² ergab sich für das Glykosid A eine Summenformel von $C_{29}H_{34}O_{15}$ (622) oder $C_{30}H_{35}O_{16}$ (651).

Bei der Berechnung auf ein Flavondiglykosid mit einem Molekulargewicht von 622 und dem Aglukon mit einem Molekulargewicht von 314 ergaben sich gute Übereinstimmungen der berechneten und gefundenen Werte.

Da das Flavongerüst 15 und der Zuckeranteil Glukose und Rhamnose je 6 C-Atome enthalten, mussten noch mindestens $29 - (15+6+6) = 2$ C-Atome in Form von Methoxylgruppen vorhanden sein.

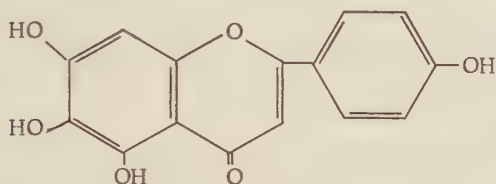
Die Methoxylgruppen-Bestimmung bei Glykosid und Aglukon A ergab zwei Methoxylgruppen im Molekül.

Damit hatten wir das Vorhandensein von zwei Methoxylgruppen nachgewiesen. Sie mussten mit zwei Hydroxylgruppen des Flavons veräthert sein. Wieviele freie, verätherte oder verglykosidierte Hydroxylgruppen im Molekül insgesamt vorhanden waren, konnten wir aus den bisherigen Ergebnissen noch nicht entnehmen.

Die Entmethylierung des Aglukons A ergab eine Substanz vom Smp. 335° . Durch Vergleich der R_f -Werte, durch die Anfärbung mit Barytwasser auf

22) R. KRZIKALLA, "Rechentafeln zur chemischen Elementaranalyse", Weinheim/Bergstrasse 1956

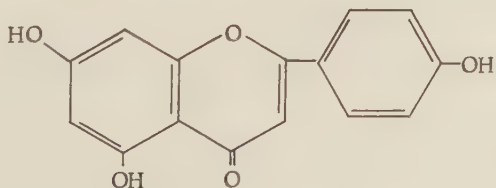
dem Papierchromatogramm²³, den Mischschmelzpunkt und das UV-Spektrum identifizierten wir das Entmethylierungsprodukt als Scutellarein (I), das 1958 von R. SEMRAU²³ aus *Scutellaria altissima* isoliert worden war. Damit war die Anzahl und die Stellung der Hydroxylgruppen im Molekül von Aglukon A festgelegt.



(I) Scutellarein

Da das Aglukon A zwei Methoxylgruppen besass, nachgewiesen durch die CH_3O -Bestimmung, mussten zwei freie Hydroxylgruppen im Molekül vorliegen. Die Phenolreaktion bei Glykosid A deutete auf freie Hydroxylgruppen hin, so dass nur eine Hydroxylgruppe mit dem Zuckeranteil verknüpft sein konnte.

Auffallend war, dass Glykosid A mit einer Substitution an den C-Atomen 5, 6 und 7 nach dem Besprühen mit Aluminiumsulfat- und basischer Bleiazetatlösung keine Fluoreszenzfarben unter dem UV-Licht ausbildete. Die Vermutung lag daher nahe, dass dieses Verhalten von der besonderen Anordnung der OH-Gruppen herrührt, denn das Apigenin (II), das ähnlich gebaut ist, wie das Scutellarein, aber keine OH-Gruppe am C-Atom 6 hat, liefert mit diesen beiden Sprühreagentien eine gelbe Fluoreszenz.



(II) Apigenin

23) R. SEMRAU, Dissertation München März 1958

Die Methylierung des Glykosides A und anschliessende saure Hydrolyse ergab ein Methylprodukt vom Smp. 201-204°. Eine entsprechende Substanz mit gleichem Schmelzpunkt ist unseres Wissens nicht beschrieben. Das Ergebnis der Methoxylgruppenbestimmung mit 29.54% CH_3O entsprach 3 Methoxylgruppen im Molekül.

Die Methylierung des Aglukons A ergab ein Methylprodukt vom Smp. 162-165°. Für das Methylprodukt eines synthetisch hergestelltem Scutellareins, dem Tetramethoxy-Scutellarein, wird der Smp. mit 162° angegeben²⁴. Aus der Methoxylgruppenbestimmung mit einem Wert von 36.07% CH_3O errechneten sich vier Methoxylgruppen für das Molekül.

Damit war ein erneuter Beweis für eine Substitution des Flavonkernes an den C-Atomen 5, 6, 7 und 4' erbracht. Ferner bedeutete die Differenz von einer Methoxylgruppe zwischen dem Methylprodukt des Glykosides und dem Methylprodukt des Aglukones, dass die Zuckerkomponente lediglich an einer Hydroxylgruppe mit dem Flavonkern verknüpft war. Glykosid A ist demnach ein Flavondiglykosid, und zwar ein Rhamno-Glukosid, vermutlich ein Rutinosid.

Die Azetylierung des Glykosides A ergab ein Azetat vom Smp. 133°. Die Azetylgruppenbestimmung mit 27.32% und 28.08% CH_3CO stimmte nicht mit dem Wert überein, der auf eine freie Hydroxylgruppe im Flavonkern und sechs freie Hydroxylgruppen im Zuckeranteil berechnet war.

Die Differenz vom gefundenen zum berechneten Wert liess sich nur so erklären, dass eine der Hydroxylgruppen des Flavonkernes nicht azetyliert wurde. Bei der Berechnung mit nur sechs azetylierbaren Hydroxylgruppen im Zuckeranteil ergab sich ein Wert von 29.58% CH_3CO , der den gefundenen Werten etwas näher kam. Das Azetylierungsprodukt war auf Grund der papierchromatographischen Untersuchungen als einheitlich anzusehen.

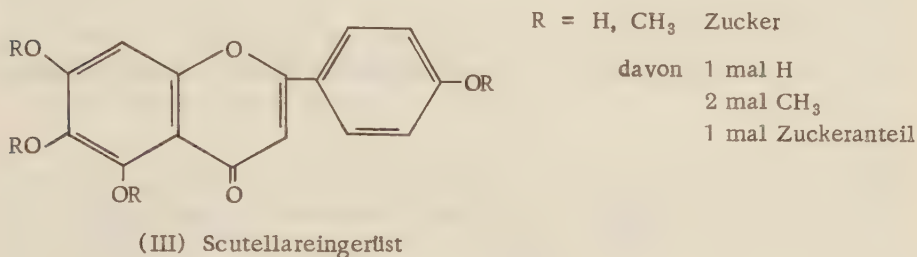
Ein ähnliches Ergebnis brachte die Azetylierung des Aglukones A. Das Azetat schmolz bei 186°. Auch hier trat eine Differenz vom gefundenen Wert zu dem auf zwei freie Hydroxylgruppen berechneten Wert auf. Rechnet man jedoch beim Azetat des Aglukones A nur mit einer azetylierbaren Hydroxylgruppe im Flavonkern, so kommen sich die Werte von 10.32% gefunden und 12.08% berechnet näher.

Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass tatsächlich nur eine freie Hydroxylgruppe im Aglukon vorhanden war, was jedoch im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen stand. Die andere Möglichkeit wäre, dass tatsächlich nur eine der zwei Hydroxylgruppen azetyliert wurde.

24) V. D. NAGESWARA SASTRI, T. R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci. 23 A, 262 (1946)

Nachdem es sich bei Glykosid A um einen Scutellarein-Abkömmling handelte und bereits R. SEMRAU²⁵ festgestellt hatte, dass Scutellarein schwer ganz azetyliert werden kann, ist die allgemeine Aussage möglich, dass Hydroxylgruppen, die sich im Ring A in ortho-Stellung befinden, schwer azetylierbar sind.

Nach den bisherigen Untersuchungen bestanden also folgende Strukturmöglichkeiten für Glykosid A (III):



Zur Klärung dieser Fragen führten wir einen Alkalibau durch.

Bei der Behandlung mit Alkali (Abb. 1) öffnet sich das Ringsystem des γ -Pyronrings unter Ausbildung einer phenolischen Hydroxylgruppe am C-Atom 9. Dann spaltet sich die Kette C₂-C₄ zwischen den C-Atomen 2 und 3. Der Benzo- γ -Pyronrest erscheint als o-Hydroxy-Azetophenon (V), das je nach der Konstitution des Flavonmoleküls mit phenolischen oder verätherten Hydroxylgruppen besetzt ist. Im weiteren Reaktionsverlauf spaltet das o-Hydroxy-Azetophenon eine Azetylgruppe ab. Es entsteht ein Phenol (VI)²⁶.

Das Seitenphenyl bildet sich unter Mitnahme von C-Atom 2 zu einer substituierten Benzoesäure (VII) um, die die Konstitution des Seitenphenyls widerspiegelt.

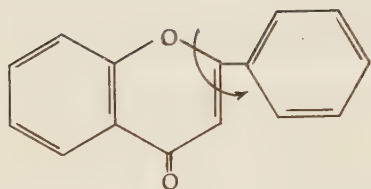
Der Zuckeranteil wird bei der Alkalibehandlung zerstört.

Aus den definierten Spaltprodukten lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des Flavons ziehen.

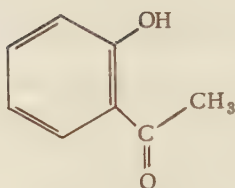
Bei der Alkalischmelze von Glykosid A konnten wir in dem Reaktionsgemisch p-Hydroxy-Benzoesäure papierchromatographisch durch Mitlaufenlassen von Testsubstanzen nachweisen.

25) R. SEMRAU, Dissertation München März 1958

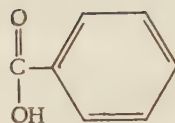
26) K. W. MERZ, Y. H. WU, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 247/46, 126 (1936)



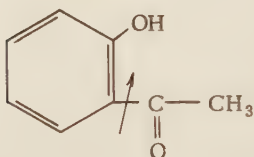
(IV) Flavon



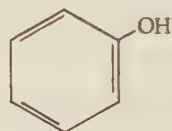
(V) o-Hydroxy-Azetophenon



(VII) Benzoessäure



(V) o-Hydroxy-Azetophenon



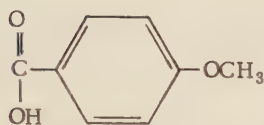
(VI) Phenol

Abb. 1 Alkalispaltung

Diese p-Hydroxy-Benzoessäure stammte aus dem Seitenphenyl von Glykosid A. Demnach hätte am C-Atom 4' eine freie Hydroxylgruppe vorhanden sein müssen.

Da jedoch unter diesen Bedingungen leicht CH_3O -Gruppen abgespalten werden, wurde ein zweiter Alkaliabbau in 25% Kalilauge durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war aber eine p-methoxy-Benzoessäure nachzuweisen, ein Beweis, dass sich ursprünglich am C-Atom 4' eine CH_3O -Gruppe befand.

Im Säureanteil des Reaktionsproduktes der Alkalispaltung von Glykosid A kristallisierte eine Substanz in feinen Nadeln aus, die auf der Koflerbank bei 170° sinterte und bei 184° schmolz. Durch Mischschmelzpunkt, UV-Spektrum und CH - und CH_3O -Bestimmung konnten wir die Substanz als p-Methoxy-Benzoesäure (VIII) identifizieren. Smp. von p-Methoxy-Benzoesäure (= Anissäure) bei $184,5^\circ\text{C}$.



(VIII) Anissäure

Im Phenolanteil des Reaktionsproduktes blieb ein öliges Rest zurück, der sich auf dem Papierchromatogramm mit diazotierter Sulfanilsäure braun und mit Eisenchlorid-Lösung blauviolett anfärben liess, jedoch keinem der üblichen Phenole zugeordnet werden konnte.

Sein R_f -Wert in IAW war, wie zu erwarten, höher, als der von Phloroazetophenon. Bei einer Substitution von Glykosid A an C_5 , C_6 und C_7 war auch ein Phenolkörper der entsprechenden Konstitution zu erwarten. Da der R_f -Wert im Laufmittel IAW bei Zunahme von Hydroxylgruppen sinkt, sich bei Zunahme der Methoxylgruppen jedoch erhöht, was W. KIRMAYER²⁷ für das Beispiel der Flavone nachgewiesen hat, war also analog bei diesem etwas einfacher gebauten Phenolkörper auf Grund seines R_f -Wertes auf eine CH_3O -Gruppe am C-Atom, 5, 6 oder 7 zu schliessen. Damit war eine gewisse Bestätigung der bisherigen Ergebnisse gegeben.

Die Isolierung eines kristallinen Produktes zu weiteren chemischen Untersuchungen gelang nicht. Auch stand uns keine Verbindung dieser Konstitution als Testsubstanz zur Verfügung.

Durch Identifizierung des Säureanteils der Alkalisplaltung von Glykosid A als p-Methoxy-Benzoesäure war das Vorhandensein einer Methoxylgruppe am C-Atom 4' des Seitenphenyls bewiesen. Damit standen noch folgende Möglichkeiten der Konstitution von Glykosid A bei einem Scutellareingerüst zur Diskussion (Abb. 2).

Formel IX ist identisch mit der Konstitution von Pectolinarin und Neolinarin, Flavonglykosiden, die u. a. von G. ZEMPLÉN und Mitarbeitern²⁸ aus *Linaria vulgaris* isoliert wurden und deren Konstitution K. W. MERZ und Y. H. WU²⁹ aufklärten.

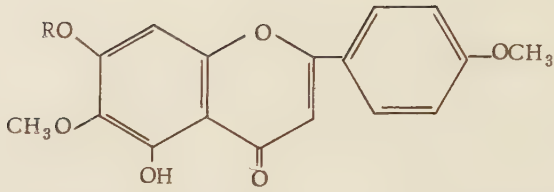
Die Verbindung der Formel IX besitzt eine freie Hydroxylgruppe, zu der zwei substituierte Hydroxylgruppen benachbart sind, woraus sich die schlechte Azetylierbarkeit ableitet.

27) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

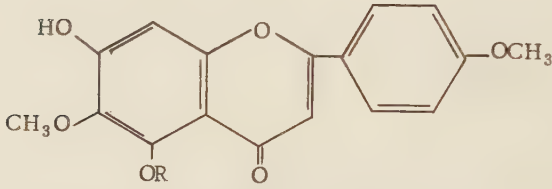
28) G. ZEMPLÉN, R. BOGNAR, Z. MESTER, Chem. Ber. **75**, 489 (1942)

29) K. W. MERZ, Y. H. WU, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **274/46**, 126 (1936)

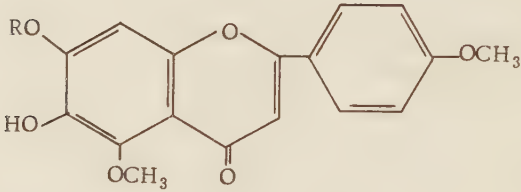
IX



X

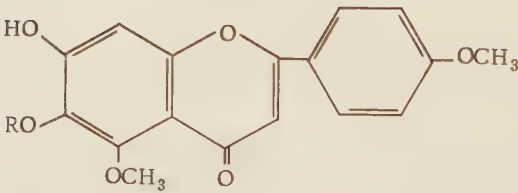


XI

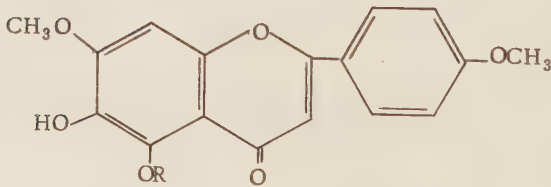


R = Zuckeranteil

XII



XIII



XIV

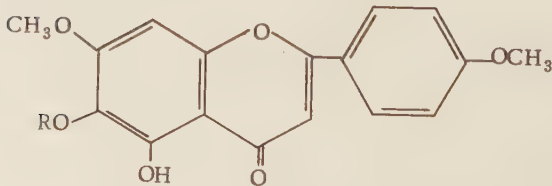


Abb. 2 Möglichkeiten der Konstitution von Glykosid A

Formel X mit einer verglykosidierten Hydroxylgruppe am C-Atom 5 bei einer freien Hydroxylgruppe am C-Atom 7 ist unwahrscheinlich, da Flavone bzw. Flavonole bevorzugt am C-Atom 7 verglykosidiert sind.

Formel XI wäre möglich.

Formel XII ist unwahrscheinlich, da eine Verglykosidierung am C-Atom 6 bei gleichzeitig freier Hydroxylgruppe am C-Atom 7 bei Flavonen bisher nicht festgestellt wurde. Auch sind der freien Hydroxylgruppe am C-Atom 7 nicht zwei mit Radikalen besetzte OH-Gruppen benachbart. Eine Substanz der Formel XIII ist am C-Atom 5 verglykosidiert, was bei den Flavonen selten vorkommt.

Formel XIV ist wie Formel XIII äusserst unwahrscheinlich.

Die Beantwortung der Frage, an welcher Stelle die zweite Methoxylgruppe lokalisiert und mit welcher Hydroxylgruppe der Zuckerrest verglykosidiert war, konnte auf physikalischem Wege durch UV-spektroskopische Untersuchungen gegeben werden.

4. Physikalische Untersuchungen von Glykosid A

Die UV-Spektren von Glykosid und Aglukon A wiesen die für Flavone typischen Extinktionsmaxima im Wellenbereich von 240-270 m μ und 330-350 m μ auf. Nach Zugabe von Natriumazetat und Aluminiumchlorid traten Maxima-Verschiebungen auf, die nach Untersuchungen verschiedener Autoren^{30,31,32} für bestimmte Hydroxylsubstitutionen charakteristisch sind. Auf Borsäurezusatz trat weder beim Glykosid noch beim Aglukon A eine Verschiebung auf³³.

Die Tatsache, dass Flavonglykoside, die am C-Atom 7 verglykosidiert sind, dasselbe UV-Spektrum aufweisen, wie ihr zugehöriges Aglukon, kann nach L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern³⁴ als ein allgemein gültiges Gesetz aufgefasst werden. T. TASAKI³⁵, S. HATTORI³⁶, L. MARCHLEWSKY und B. SKARZYNSKY³⁷ und T. A. GEISSMAN³⁸ hatten schon auf diese Erscheinung bei Flavonglykosiden hingewiesen.

30) J. B. HARBORNE, Chem. and Ind. 1142 (1954)

31) T. SWAIN, Chem. and Ind. 1480 (1954)

32) L. JURD, T. A. GEISSMAN, J. org. Chem. 21, 1395 (1956)

33) L. JURD, Arch. Biochem. biophys. 63, 376 (1956)

34) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

35) T. TASAKI, J. Tokyo Chem. Soc. 47, 299 (1926)

36) S. HATTORI, Acta phytochim. 4, 63 (1928)

37) L. MARCHLEWSKY, B. SKARZYNSKY, Biochem. Z. 297, 56 (1938)

38) T. A. GEISSMAN in K. PAECH und M. V. TRACEY "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, Bd. III, S. 485

Da Glykosid A und Aglukon A in ihren UV-Spektren übereinstimmten, konnte eine Zuckerstellung am C-Atom 7 angenommen werden. Es standen also nur noch die Formeln IX und X (Abb. 2 S. 12) zur Diskussion.

Nach Beobachtungen von T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER³⁹ an Apigenin-7- und 4'-Derivaten werden die UV-Maxima von Flavonen nach Zugabe von Natriumazetat stark bathochrom verschoben, wenn eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 7 und eine verglykosidierte oder verätherte Hydroxylgruppe am C-Atom 4' vorliegt. Bei einer Besetzung der Hydroxylgruppe am C-Atom 7 und einer freien Hydroxylgruppe am C-Atom 4', treten nur geringe Verschiebungen auf. Die starke Verschiebung der UV-Absorptionsmaxima nach Zugabe von Natriumazetat bei Aglukon A bestätigte auf UV-spektroskopischem Wege eine besetzte Hydroxylgruppe am C-Atom 4' und eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 7 bei Aglukon A. Bei Glykosid A trat keine Verschiebung auf.

Nach L. JURD⁴⁰ sind nur zwei benachbarte freie Hydroxylgruppen bei Flavonen zur Komplexbildung mit Borsäure befähigt, was sich in einer stark bathochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima ausdrückt. Da wir nach Zusatz von Borsäure keine Verschiebungen beobachten konnten, schied eine C₅-C₆- oder eine C₆-C₇-Orthogruppierung freier Hydroxylgruppen bei Aglukon A aus. Die Methoxylgruppe musste sich demnach am C-Atom 6 befinden.

Der Grad der Verschiebungen auf Aluminiumchloridzusatz setzt einen Chelatbildung zwischen der Carbonylgruppe am C-Atom 4 und einer benachbarten freien Hydroxylgruppe voraus⁴¹. Nach den bisherigen Befunden konnte dies nur eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 sein, da kein Flavonol mit einer freien Hydroxylgruppe am C-Atom 3 vorlag. C-Atom 5 konnte also nicht durch eine Methoxylgruppe blockiert sein. Eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 6 ist bei einer Methoxylgruppe am C-Atom 5 nicht befähigt, einen Chelat auszubilden.

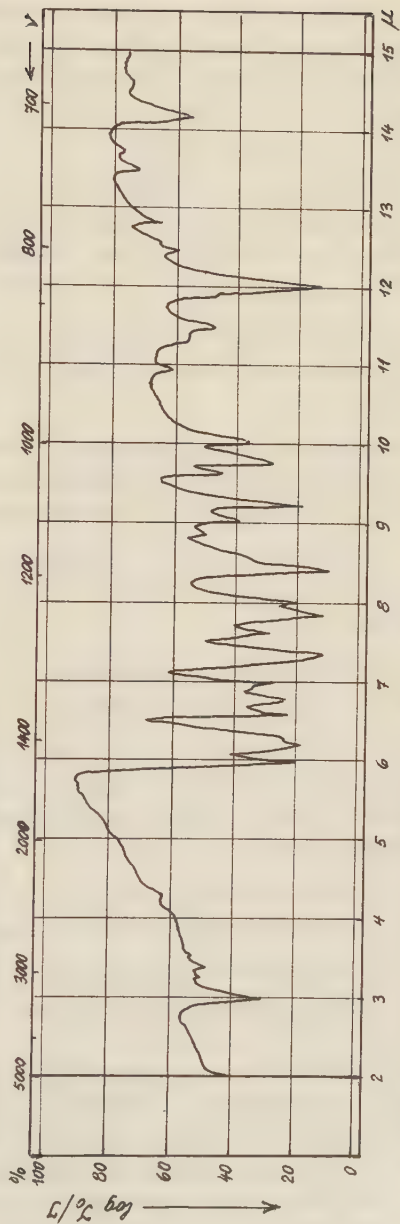
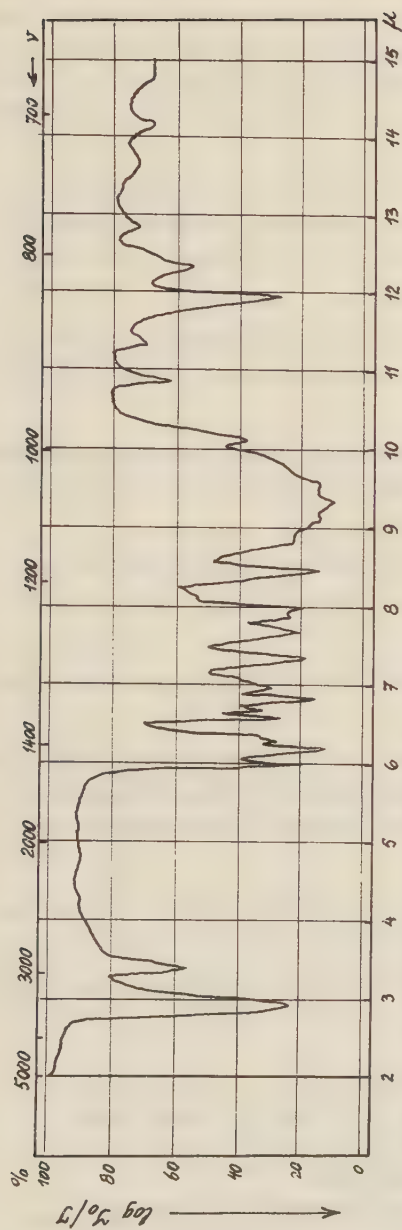
Die Annahme, dass es sich bei dem aus *Cirsium oleraceum* isolierten Flavonglykosid A um Pectolinarin handeln würde, gewann immer mehr an Wahrscheinlichkeit.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die IR-Spektren von Glykosid A und Aglukon A (Abb. 3 und 4) herangezogen.

39) T. A. GEISSMAN, U. KRANEN-FIEDLER, Naturwiss. 43, 226 (1956)

40) L. JURD, Arch. Biochem. biophys. 63, 376 (1956)

41) L. JURD, T. A. GEISSMAN, J. org. Chemistry 21, 1395 (1956)



Die Carbonylbande der Flavone trat in den IR-Spektren an der erwarteten Stelle auf. Da eine Hydroxylgruppe am C-Atom 3 ausschied, musste auf Grund der Lage der Bande bei 1655 cm^{-1} eine freie oder methylierte Hydroxylgruppe am C-Atom 5 vorhanden sein^{42,43}. Gleichzeitig zeigte der typische Kurvenverlauf, dass Glykosid A ein Flavonglykosid ist^{44,45}.

Glykosid A zeigt im Wellenbereich $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ eine starke Absorption. Nach L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁴⁶ liegen hier die Absorptionsbanden der C-OH-Valenzschwingungen der Zuckeranteile, die für Glykoside typisch sind. Im IR-Spektrum von Aglukon A fehlten diese Banden.

Aus der etwa gleich grossen Intensität dieser C-OH-Banden des Zuckeranteils im IR-Spektrum mit der CO-Bande des Flavonkernes liess sich ferner ein Diglykosid⁴⁶ ableiten.

Die zwischen 837 und 798 cm^{-1} auftretende Bande ist nach der von H. DANNENBERG und Mitarbeitern⁴⁷ vorgeschlagenen Zuordnungstabelle der γ -Schwingung eines p-substituierten Seitenphenyls zuzuordnen.

Glykosid und Aglukon A zeigten beide eine starke Absorption bei 835 cm^{-1} , die nach F. GLOGGENGIESSER⁴⁸ für eine p-Substitution im Seitenphenyl typisch sein soll.

Nach allen diesen Befunden war für Glykosid A nur die Konstitution des Pectolinarins (Formel IX) möglich.

Zur Sicherung dieser Vermutung, Glykosid A könnte mit Pectolinarin identisch sein, wurde ein Vergleichsspektrum von authentischem Pectolinarin angefertigt. Wie Abb. 5 zeigt, herrscht völlige Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum von Glykosid A (Abb. 3).

Auch die IR-Spektren von Aglukon A (Abb. 4) und dem Aglukon von Pectolinarin, dem Pectolinarigenin (Abb. 6) zeigten Identität.

Ein Vergleich der Schmelzpunkte und die Ausführung eines Mischschmelzpunktes bestätigten die anderen Ergebnisse.

42) G. ENGLETT, J. org. Chemistry 23, 93 (1958)

43) H. L. HERGERT, E. F. KURTH, J. Americ. Chem. Soc. 75, 1622 (1953)

44) F. GLOGGENGIESSER, Dissertation München Juni 1957

45) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

46) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

47) H. DANNENBERG, U. SCHIEDT, W. STEIDLE, Z. Naturforsch. 86, 269 (1953)

48) F. GLOGGENGIESSER, Dissertation München Juni 1957

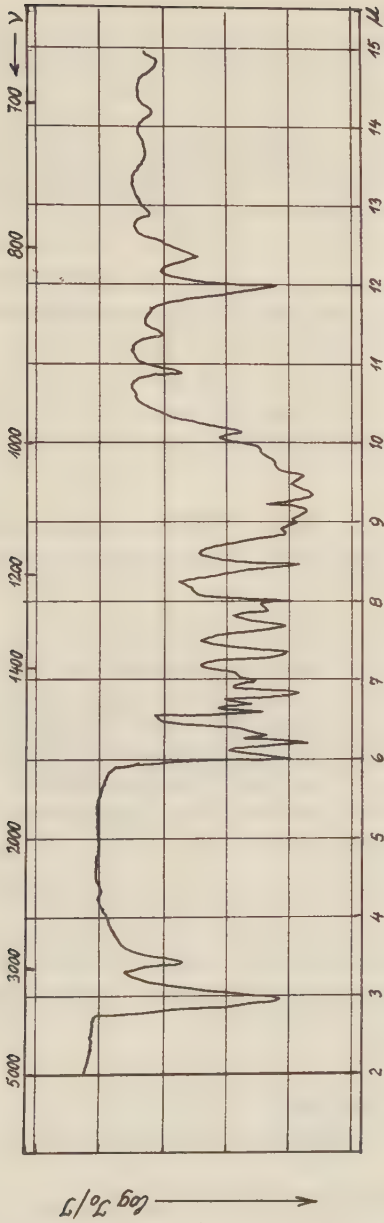


Abb. 5 IR-Spektrum von Pectolinarin

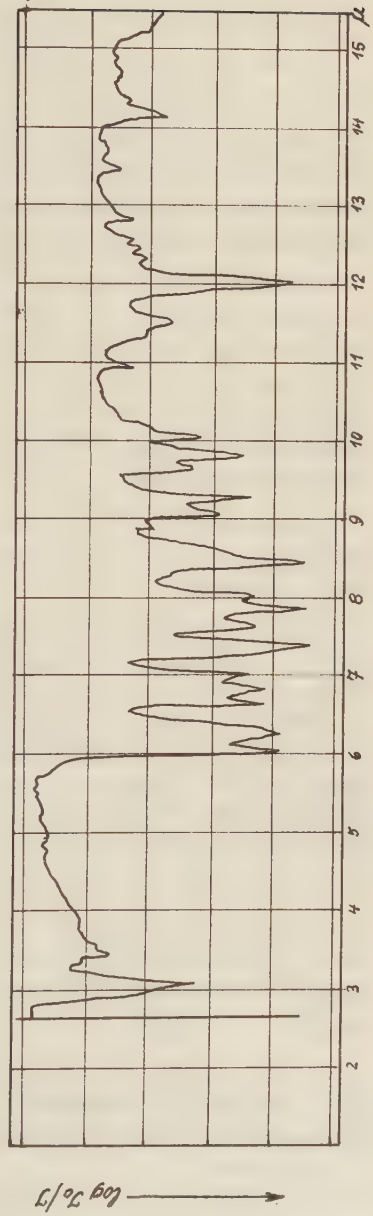


Abb. 6 IR-Spektrum von Pectolinarigenin

5. Chemische Untersuchungen von Glykosid B

Bei der Isolierung von Glykosid A aus *Cirsium oleraceum* konnte durch wiederholte Trennung über Polyamidsäulen Glykosid A von Glykosid B abgetrennt werden.

Die Trennung gelang schneller und besser, wenn das Flavonmischkristallisat mit 10% Schwefelsäure hydrolysiert und erst dann die Trennung über Polyamidsäulen mit Methanol vorgenommen wurde. Eine 5% Schwefelsäure hydrolysierte nur das Glykosid A, nicht aber das Glykosid B.

Glykosid B kristallisierte in kleinen weissen Kristallen aus und zeigte auf der Koflerbank einen Smp. von 268-270°. Der R_f-Wert von Glykosid B auf dem Papierchromatogramm und die Fluoreszenzfarben unter dem UV-Licht deuteten auf ein Flavonglykosid mit sehr wenigen freien Hydroxylgruppen hin⁴⁹. Eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3 war auf Grund der papierchromatographischen Untersuchungsergebnisse nicht möglich, eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 dagegen wahrscheinlich⁴⁹.

Die quantitative Hydrolyse des Glykosids B mit 10% Schwefelsäure ergab eine Ausbeute von 56.0% eines in gelben Nadeln auskristallisierenden Aglukons (Smp. 275-277°).

Auf Grund derselben Fluoreszenzfarben von Glykosid B und Aglukon B unter dem UV-Licht konnte kein am C-Atom 3 verglykosidiertes Flavonol vorliegen⁴⁹.

Der Zuckeranteil mit 44.0% entsprach dem eines Flavon-di-glykosides. Er bestand aus Glukose und Rhamnose, wie durch papierchromatographischen Vergleich mit Testlösungen durch Besprühen mit Silbernitrat-Lösung und Anilinphtalat-Lösung, Vergärung der Glukose mit Presshefe und Darstellung des Rhamnosazons nachgewiesen wurde.

Aglukon B ergab einen positiven Reduktionstest mit Zinksalzsäure⁵⁰ und eine negative Molisch-Probe. Der negative Zitronensäure-Zirkonoxychlorid-Test^{51, 52} zeigte das Fehlen einer freien Hydroxygruppe am C-Atom 3 an, während die Eisenchloridreaktion auf eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 hinwies⁵³.

49) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

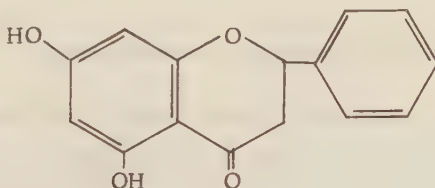
50) R. WILLSTÄTTER, H. MALLISON, S. B. preuss. Acad. Wiss. phys. math. Kl. 769 (1914)

51) L. HÖRHAMMER, R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951)

52) L. HÖRHAMMER, K. H. MÜLLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 287/59, 310 (1954)

Es lag also bei Glykosid B ein Flavon-Diglykosid vor, das sehr wahrscheinlich eine freie Hydroxygruppe am C-Atom 5 besass und dessen Zuckeranteil aus Glukose und Rhamnose bestand.

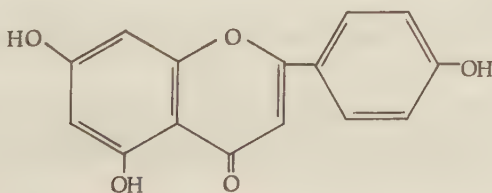
Die CH- und CH₃O - Bestimmungen bei Glykosid B (54.81% C, 5.63% H, 6.29% CH₃O) und Aglukon B (68.04% C, 4.93% H, 10.74% CH₃O) stimmten innerhalb der Fehlergrenze mit einem Flavondiglykosid bzw. einem Flavonaglukon überein. Der Prozentgehalt an CH₃O entsprach einer Methoxygruppe im Molekül. Die von W. KIRMAYER⁵⁴ für Glykosid B vermutete Struktur eines Chrysin-Rhamnoglukosides traf demnach nicht zu. Das 5.7-Hydroxy-Flavon Chrysin besitzt keine Methoxygruppe im Molekül (XV).



(XV) Chrysin

Die Entmethylierung des Aglukons B ergab ein Produkt vom Smp. 348-350°. Es kristallisierte in hellgelben Nadeln aus und zeigte, auf dem Chromatogramm unter dem UV-Licht einheitlich braun fluoreszierende Flecken.

Ein Mischschmelzpunkt mit authentischem Apigenin (XVI) ergab keine Depression. Die CH-Werte stimmten mit denen des authentischen Apigenins gut überein, ebenso die R_F-Werte in mehreren Lösungsmittelsystemen.

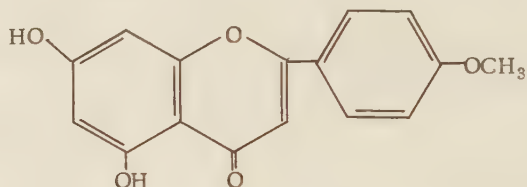


(XVI) Apigenin

53) L. H. BRIGGS, R. H. LOCKER, J. Chem. Soc. 3131 (1951) (London)

54) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

Damit war die Grundstruktur von Glykosid B als einem Methyläther des Apigenins geklärt. Eine Methoxylgruppe in C_{4'}-Stellung des Seitenphenyls (XVII) wäre sehr gut mit den R_f-Werten auf dem Papierchromatogramm vereinbar, da diese mit denen des Chrysin (XV S. 19) annähernd übereinstimmen⁵⁵. Bekanntlich beeinflussen Methoxylgruppen an weniger aciden OH-Gruppen, wie sie beispielsweise das 4'-OH oder das 5-OH darstellen, die Laufgeschwindigkeit nur wenig.



(XVII) Apigenin-4'-Methyläther

Die Alkalisplaltung von Glykosid B ergab nach Trennung in einen sauren und phenolischen Anteil nur in der sauren Ausschüttelung ein kristallines Produkt, das bei 184° schmolz. Eine Verbindung vom gleichen Schmelzpunkt war auch im Säureanteil der Alkalisplaltung von Glykosid A aufgetreten. Wie bei Glykosid A handelte es sich bei dieser Verbindung um Anissäure (XVIII), die wir durch Vergleich mit authentischer Anissäure in ihrem Mischschmelzpunkt identifizierten.



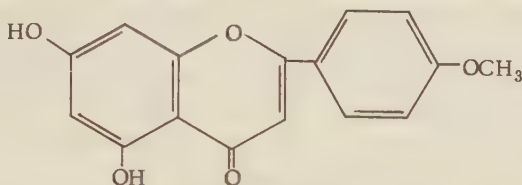
(XVIII) Anissäure

Die mikroanalytischen Bestimmungen ergaben Übereinstimmung der gefundenen und der auf Anissäure berechneten Werte.

Da die Anissäure bei der Alkalisplaltung aus dem Seitenphenyl von Aglukon B entstanden war, bedeutete dies, dass sich die Methoxylgruppe, wie vermutet, am C-Atom 4' des Seitenphenyls befand.

55) T.B. GAGE, C.D. DOUGLASS, S.H. WENDER, Analytic.Chem. 23, 1582 (1951)

Aglukon B ist demnach ein Apigenin-4'-Methyläther oder ein 5,7-hydroxy-4'-methoxy-Flavon (XIX), das auch unter dem Namen Acacetin in der Literatur beschrieben ist.



(XIX) Aglukon B

Die Methylierung von Aglukon B, ausgeführt mit Dimethylsulfat, ergab ein weisses kristallines Methylprodukt mit einem Smp. = 176°C. Da die Methoxylgruppenbestimmung nur 2 OCH₃ anzeigte, war offenbar von den beiden noch freien OH-Gruppen im Acacetinmolekül nur eine methyliert worden.

Vermutlich handelte es sich um die C₅-OH-Gruppe, da diese wegen Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe allgemein schwer substituierbar ist. Der Schmelzpunkt unseres Methylproduktes stimmte aber mit einem von K. W. MERZ und Y. H. WU⁵⁶ bei der Diazomethan-Methylierung von Linarigenin erhaltenen Monomethyläther des Acacetins einigermassen überein. (Smp. = 170°C).

In der Literatur findet sich für ein Methylprodukt des Acacetins noch ein weiterer Schmelzpunkt von 152-154°C⁵⁷. Obwohl hier auch mit Dimethylsulfat gearbeitet wurde, liegt diesem eindeutig der Trimethyläther des Apigenins bzw. der Dimethyläther des Acacetins zu Grunde. Um auch dieses Produkt durch Nachmethylierung zu erhalten, fehlte es leider an einer entsprechenden Ausgangsmenge.

Seltsamerweise war aber das Glykosid B total methyliert, denn nach der Hydrolyse wurde eine Verbindung kristallin erhalten (Smp. = 276-280°C), die nach Mikro-Zeisel 2 OCH₃-Gruppen abspaltete.

Die Ergebnisse der Methylierung erhärteten weiter die bisherigen Befunde, dass in Glykosid B ein Acacetinderivat vorliegen musste. Nun galt es noch zu klären, an welcher Hydroxylgruppe der Zuckeranteil mit dem Flavonkern verknüpft war.

56) K. W. MERZ, Y. H. WU, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 274/46, 126 (1936)

57) N. NARASIMHACHARI, R. SESHADRI, Proc. Indian. Acad. Sci. 30 A, 151 (1949)

In Frage kamen die Stellungen 5 und 7, wobei die Stellung am C-Atom 7 die grössere Wahrscheinlichkeit besass, da die bisher gefundenen Flavonglykoside bevorzugt am C-Atom 4' oder 7 verglykosidiert sind.

Acacetin ist identisch mit dem Aglukon des Linarins, dem Linarigenin. Linarin selbst ist Acacetin-7-Rutinosid. Da der Zuckeranteil bei Glykosid B aus Glukose und Rhamnose bestand, lag die Vermutung nahe, dass Glykosid B mit Linarin identisch wäre. Wir isolierten deshalb anschliessend zur Strukturverhärtung das Linarin als Test- und Vergleichssubstanz aus Linarin vulgaris.

6. Physikalische Untersuchungen an Glykosid B

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen ergaben die für Flavone typischen Maxima und charakteristischen Verschiebungen auf Zusatz verschiedener Reagenzen zur Messlösung. Die Auswertung dieser Messungen ergab folgendes:

Da sich Glykosid B und Aglukon B in ihren UV-Spektren decken, liegt nach den Untersuchungen von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern^{5,8} und F. GLOGGENGIESSER^{5,9} ein Flavonglykosid vor, das am C-Atom 7 verglykosidiert ist.

Der Grad der Verschiebungen auf Natriumazetatzusatz bei Aglukon B deutete auf eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 7 und eine besetzte Hydroxylgruppe am C-Atom 4' hin, was T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER^{6,10} durch Versuche an verschiedenen Apigenin-7 und 4'-Derivaten nachgewiesen haben. Bei Glykosid B mit einer besetzten Hydroxylgruppe am C-Atom 7 und 4' trat diese Verschiebung nicht auf.

Eine Orthogruppierung freier Hydroxylgruppen war bei Glykosid und Aglukon B nicht vorhanden. Nach L. JURD^{6,1} hätte sich eine solche in einer deutlichen Verschiebung der Maxima nach Zugabe von Borsäure zeigen müssen.

Die Verschiebung nach Zusatz von Aluminiumchlorid zeigte, dass eine freie Hydroxylgruppe der Carbonylgruppe benachbart war. Da eine Flavonstruktur vorlag, konnte dies nur das C₅-Hydroxyl sein.

Im IR-Spektrum von Glykosid B (Abb. 7) und Aglukon B (Abb. 8) erschien die Carbonylbande bei 1650 cm⁻¹, die entsprechend der Diskussion auf Seite 16 auf eine freie Hydroxylgruppe am C-Atom 5 deutete. Auch der Unterschied im

58) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

59) F. GLOGGENGIESSER, Dissertation München Juni 1957

60) T. A. GEISSMAN, U. KRANEN-FIEDLER, Naturwiss. 43, 226 (1956)

61) L. JURD, Arch. Biochem. Biophys. 63, 376 (1956)

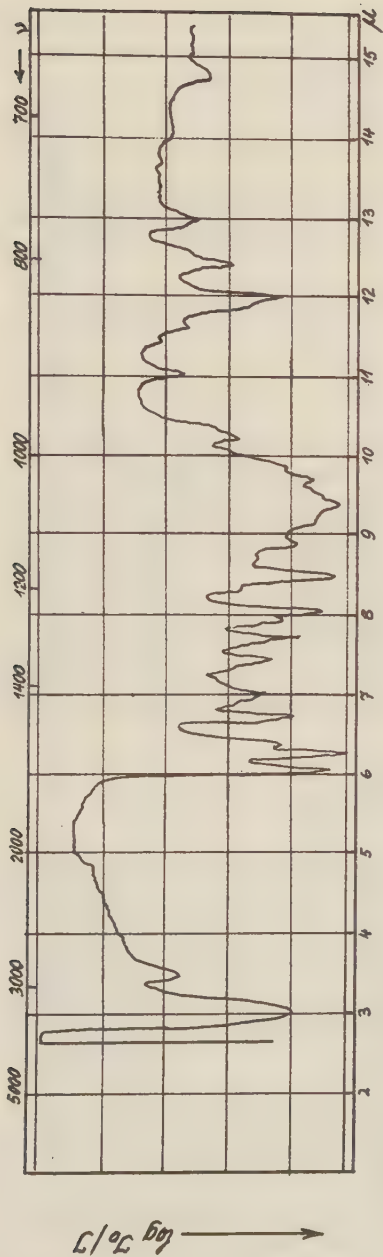


Abb. 7 IR-Spektrum von Glykosid B

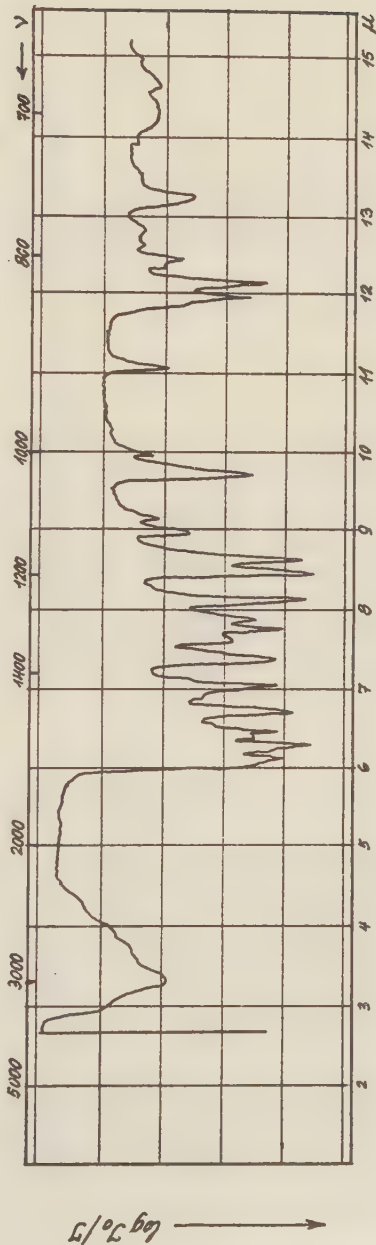


Abb. 8 IR-Spektrum von Aglukon B

Abb. 9 IR-Spektrum von Linarin

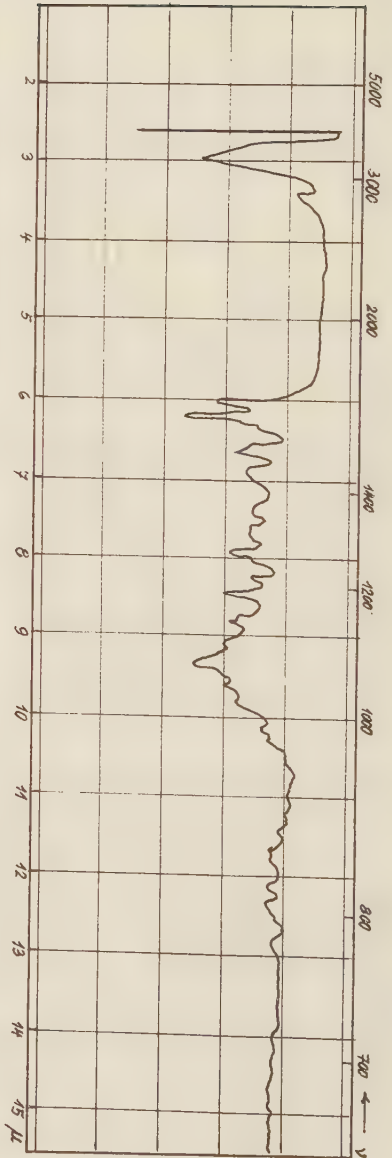
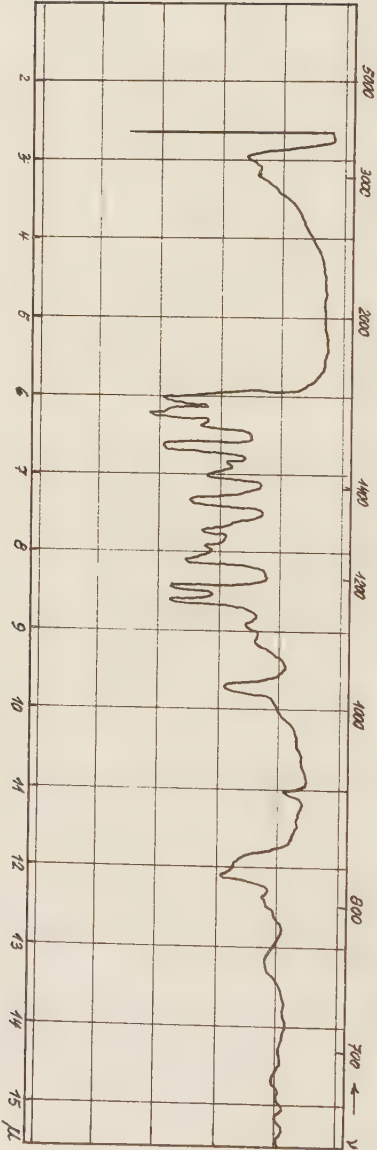


Abb. 10 IR-Spektrum von Linarigenin



Spektrum von Glykosid B gegenüber dem Aglukon war besonders im Wellenbereich von $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ deutlich erkennbar.

Aus der Absorption im Bereich von $12-13\mu$ war, wie bei Glykosid A, eine p-Substitution im Seitenphenyl abzuleiten.

Durch die Darstellung von Linarin aus *Linaria vulgaris* (siehe S. 32) war ein Schmelzpunktsvergleich und ein IR-Vergleich von Linarin (Abb. 9) mit Glykosid B (Abb. 7) und von Linarigenin (Abb. 10) mit dem Aglukon B (Abb. 8) möglich.

Wie aus der Gegenüberstellung (Abb. 7 - 10) hervorgeht, herrscht in beiden Fällen völlige Übereinstimmung.

7. Zusammenfassung

Sämtliche Befunde lassen es als sicher erscheinen, dass das Kraut von *Cirsium oleraceum* neben Pectolinarin auch Linarin enthält. Beide Verbindungen sind auf Grund ihrer ähnlichen Konstitution schwierig von einander zu trennen. Sie kommen ebenfalls zusammen in den Blüten und im Kraut von *Linaria vulgaris* vor⁶². Die abweichenden Ergebnisse unserer Untersuchungen von den in der Literatur beschriebenen Befunden, erklären wir damit, dass bei den bisherigen Arbeiten mit unreinen Substanzen gearbeitet wurde, was bei der sehr nahen chemischen Verwandtschaft der beiden Flavone und der damit verbundenen schwierigen Trennung leicht erklärlich ist.

III. Glykosid C aus *Trifolium campestre*

Im Rahmen von Untersuchungen über das Vorkommen von Isoflavonen in einheimischen Futterleguminosen isolierte H. GRASMAIER⁶³ aus *Trifolium campestre* ein Flavonglykosid, das D.H. CURNOW und R.C. ROSSITER⁶⁴ bei ihren papierchromatographischen Untersuchungen an einigen Kleearten als "genisteinartige Verbindung" beschrieben hatten. H. GRASMAIER⁶³ konnte jedoch nachweisen, dass es sich bei dieser Substanz nicht um ein Isoflavon, sondern um ein Flavonderivat handelte.

H. GRASMAIER⁶³ vermutete, dass das von ihm aus *Trifolium campestre* isolierte Flavon mit dem von uns aus *Cirsium oleraceum* isolierten Glykosid A identisch sei, da sich beide auf dem Papierchromatogramm ähnlich verhielten. Eine

62) T. KLOBB, Compt. rend. d. s. Acad. Sci. 154, 331 (1907)

63) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

64) D.H. CURNOW, R.C. ROSSITER, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. 33, 243 (1955)

Vergleichssubstanz stand nicht mehr zur Verfügung, so dass eine Nachisolierung des Glykosides erforderlich war, um die chemischen Eigenschaften der beiden Glykoside miteinander zu vergleichen.

1. Isolierung

Das Kraut von *Trifolium campestre* sammelten wir am gleichen Standort, wie von H. GRASMAIER⁶⁵ angegeben (bei Fürstenfeldbruck), und stellten aus dem zerkleinerten und getrockneten Material durch Extraktion im Soxhletapparat einen methanolischen Extrakt her, den wir durch Wasserzusatz vom Chlorophyll befreiten.

Das Chromatogramm dieses Extraktes zeigte unter dem UV-Licht eine Aufreihung von 15 deutlich markierten Flavonflecken. Es galt nun, aus diesem Gemisch das in Frage kommende Glykosid vom R_f -Wert 0.85 in IAW und 0.55 in BEW zu isolieren.

Im Gegensatz zu H. GRASMAIER⁶⁵ verwendeten wir zur Trennung nicht Magnesiumtrisilikat als Adsorptionsmittel und Äthylazetat als Laufmittel, sondern setzten die wesentlich leistungsfähigere Methanoleluatation an Polyamidsäulen ein.

Auf diese Weise gewannen wir über mehrere Polyamidsäulen aus dem Gemisch der 15 Flavone das im folgenden als Glykosid C bezeichnete Flavon, von dem wir annahmen, dass es mit dem von H. GRASMAIER⁶⁵ isolierten Glykosid aus *Trifolium campestre* identisch war.

2. Vergleichende Untersuchungen

Die analytischen Werte stimmten mit den von H. GRASMAIER⁶⁵ beschriebenen Untersuchungsergebnissen nicht ganz überein. Es zeigte sich eine starke Differenz im Schmelzpunkt, die Esterbande im IR-Spektrum fehlte völlig und eine Acetylgruppe konnte mikrochemisch nicht nachgewiesen werden. Die Aglukone stimmten etwas besser überein.

Überraschenderweise fanden wir aber, dass Glykosid C mit Glykosid A aus *Cirsium oleraceum*, dem Pectolinarin, identisch war. Ein Mischschmelzpunkt ergab keine Depression.

In der nachfolgenden Tabelle sind die analytischen Daten der Glykoside und Aglukone zum Vergleich gegenübergestellt.

65) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

Tabelle 1
Vergleich der Glykoside

	Smp.	% C	% H	% CH ₃ O	UV-Maxima	
					1. Max.	2. Max.
Glykosid C	275	55.85	5.62	9.92	275	330
Glykosid Grasmaier	237	55.61	5.47	-	277	330
Pectolinarin	275	55.95	5.46	9.97	275	330

Tabelle 2
Papierchromatographisches Verhalten der Glykoside

	R _f -Werte		Fluoreszenz im UV-Licht		
	IAW	BEW	unbespr.	Al. sulf.	bas. Bleiaz.
Glykosid C	0.85	0.55	dunkelbr.	dunkelbr.	braun
Glykosid Grasmaier	0.87	0.62	dunkel	dunkel	gelbgrün
Pectolinarin	0.85	0.55	dunkelbr.	dunkelbr.	braun

Tabelle 3
Säurehydrolyse der Glykoside

	% Aglukon	% Zucker	Zuckerart
Glykosid C	51.9	48.1	Glukose + Rhamnose
Glykosid Grasmaier	52.6	47.4	Glukose + Rhamnose
Pectolinarin	50.4	49.6	Glukose + Rhamnose

Das aus Glykosid C durch Säurehydrolyse gewonnene Aglukon C differierte gleichfalls in einigen analytischen Werten mit dem von H. GRASMAIER⁶⁶ beschriebenen Aglukon. Völlige Identität herrschte zwischen Aglukon C und Aglukon A, dem Pectolinarigenin.

66) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

Tabelle 4
Vergleich der Aglukone

	Smp.	% C	% H	% CH ₃ O	UV-Maxima	
					1. Max.	2. Max.
Aglukon C	220-223	65.19	4.63	18.21	275	335
Aglukon Grasmaier	216-217	-	-	6.58	277	330
Pectolinagenin	220-223	64.96	4.46	19.75	275	335

Tabelle 5
Papierchromatographisches Verhalten der Aglukone

	R _F -Werte		Fluoreszenz im UV-Licht		
	IAW	BEW	unbespr.	Al. sulf.	bas. Bleiaz.
Aglukon C	0.55	0.90	dunkelbr.	dunkelbr.	braun
Aglukon Grasmaier	0.61	0.88	-	-	-
Pectolinarigenin	0.55	0.90	dunkelbr.	dunkelbr.	braun

Da von Glykosid GRASMAIER keine Substanz mehr vorhanden war, ist jetzt schwer zu entscheiden, worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind. Diese könnten ihre Ursache darin haben, dass während der Aufarbeitung mit Äthylazetat eine Veresterung stattgefunden hatte. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich in der Pflanze genuin ein Essigsäureester vorgelegen hatte, der dann bei dem von uns angewandten Isolierungsschema zerstört wurde. Schliesslich kann die Gegenwart bzw. das Fehlen dieses Esters, da Standortunterschiede nicht in Frage kommen, von der Erntezeit abhängig sein.

Da die Aglukone jedoch besser übereinstimmten und H. GRASMAIER⁶⁷ mit Äthylazetat gearbeitet hatte, ist die erste Vermutung wahrscheinlicher.

Ein Vergleich der CH-Werte, der Spektren und sonstiger analytischer Daten unseres Glykosides ergab völlige Übereinstimmung mit Pectolinarin.

67) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

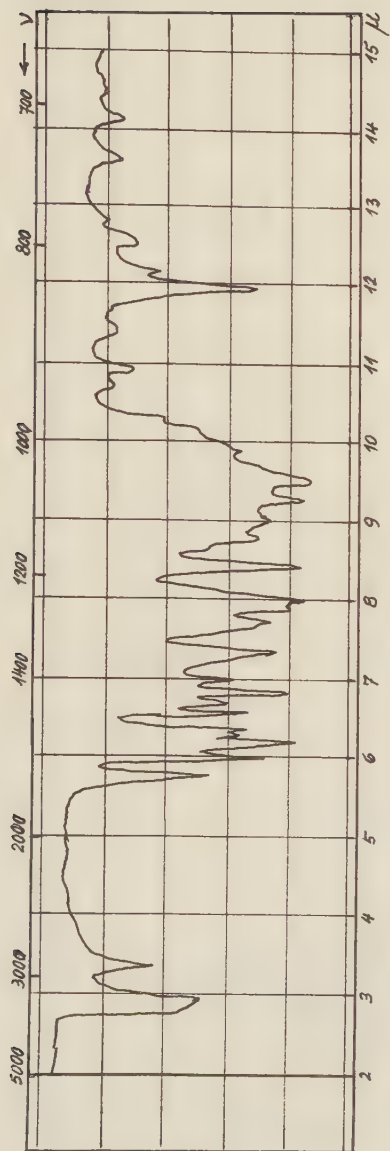


Abb. 12 IR-Spektrum von Glykosid Grasmaier

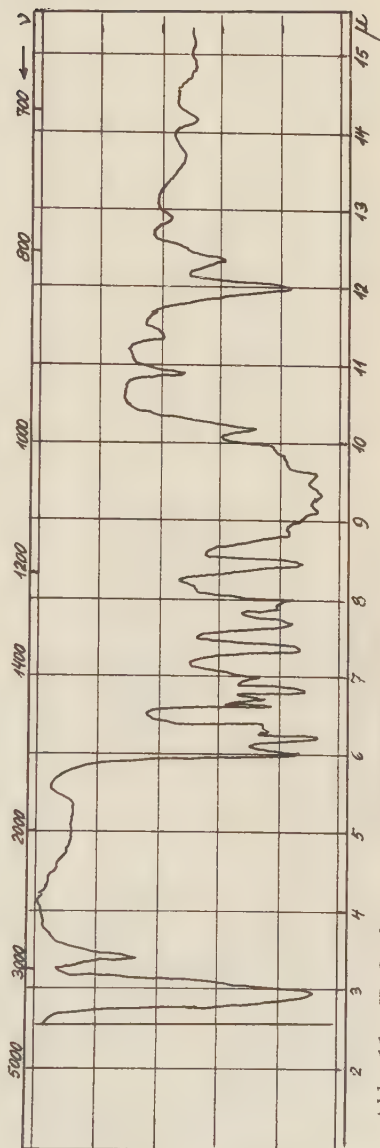


Abb. 11 IR-Spektrum von Glykosid C

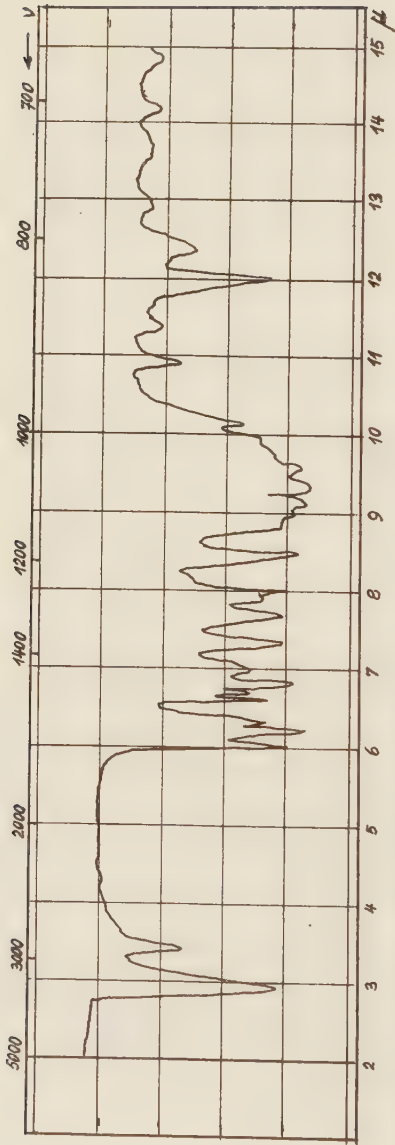


Abb. 13 IR-Spektrum von Pectolinarin

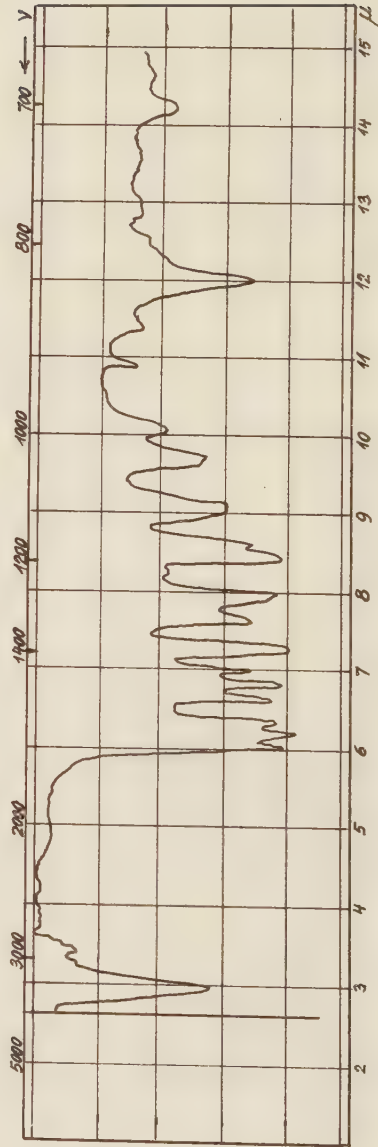


Abb. 14 IR-Spektrum von Aglukon C

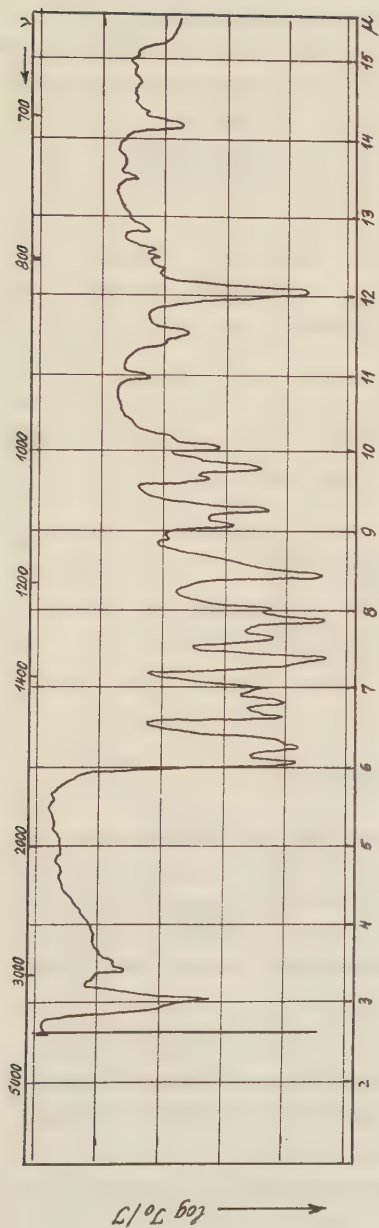


Abb. 15 IR-Spektrum von Aglukon Grasmaier

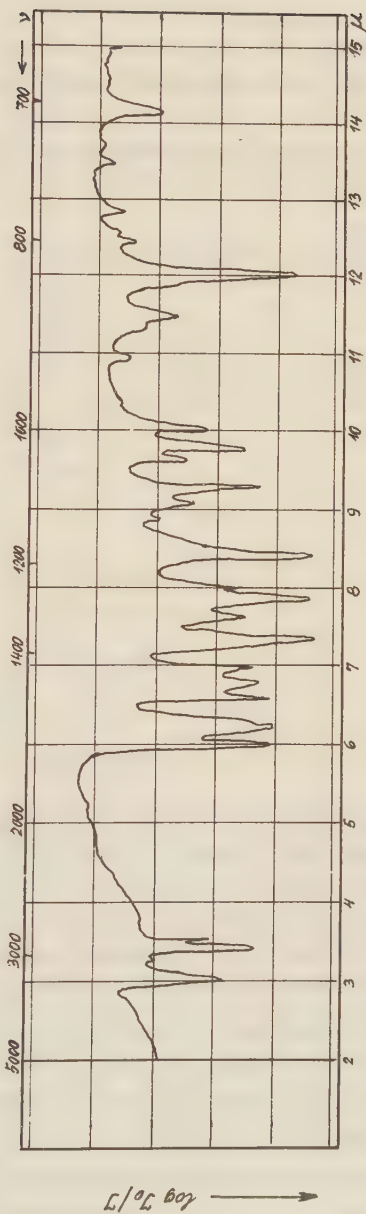
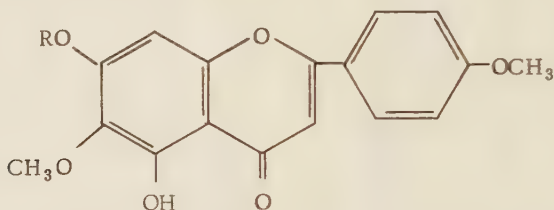


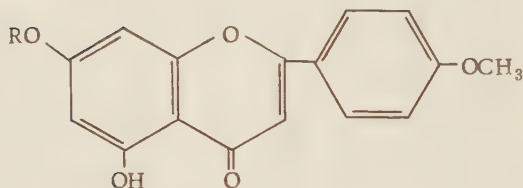
Abb. 16 IR-Spektrum von Pectolinarigenin

IV. Isolierung von Linarin und Pectolinarin aus *Linaria vulgaris*

Nachdem sämtliche Untersuchungsergebnisse bei Glykosid A auf das Vorliegen von Pectolinarin (XX) und bei Glykosid B auf Linarin (XXI) deuteten, isolierten wir diese beiden Flavonglykoside aus *Linaria vulgaris* als Testsubstanzen.



(XX) Pectolinarin (R = Rutinose)



(XXI) Linarin (R = Rutinose)

Zur Isolierung extrahierten wir das getrocknete Kraut im Soxhletapparat mit Methanol. Die R_f -Werte von Linarin und Pectolinarin im Gesamtextrakt stimmten zwar nicht ganz mit denen der reinen Glykoside A und B überein, da R_f -Verschiebungen in Gegenwart von Verunreinigungen häufig feststellbar sind, doch bestand auf Grund ihres Verhaltens gegenüber verschiedenen Farbreaktionen kein Zweifel, dass hier die gesuchten Verbindungen vorlagen.

Ebenso wie bei der Isolierung von Glykosid A und B gaben wir den von Chlorophyll befreiten wässrigen Extrakt über eine Polyamidsäule, eluierten die Säule mit Methanol und fingen das unter dem UV-Licht als braune Zone sichtbare Eluat in Fraktionen auf.

Aus den vereinigten reinen Fraktionen kristallisierten wir das Pectolinarin und das Linarin aus. Smp. von Pectolinarin = 275°C. Smp. von Linarin = 270-273°C.

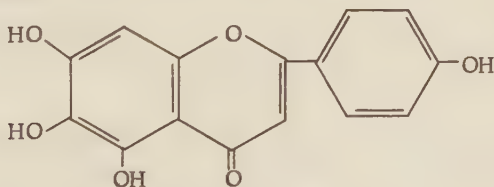
Damit war gleichzeitig eine neue Möglichkeit gegeben, die schwer trennbaren Verbindungen Linarin und Pectolinarin auf einem einfachen Wege ohne Verluste rein darzustellen.

Durch Säurehydrolyse der Mutterlaugen gewannen wir die Aglukone Pectolinarigenin und Linarigenin, die wir gleichfalls als Testsubstanzen verwendeten. Smp. von Pectolinarigenin = 220-223°C. Smp. von Linarigenin = 275-280°C.

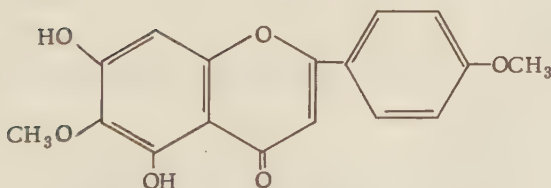
V. Über das Vorkommen von Linarin und Pectolinarin im Pflanzenreich

1907 wurden Linarin und Pectolinarin erstmals von T. KLOBB⁶⁸ beschrieben, der die beiden Naturstoffe aus den Blüten von *Linaria vulgaris* L. isolierte, ihnen die Namen gab und ihre Glykosidnatur feststellte.

1930 erhielten F. WESSELY und G.H. MOSER⁶⁹ bei Syntheseversuchen des Scutellareins (XXII), dessen 6,4'-Methyläther (XXIII), der mit dem Pectolinarigenin, dem Aglukon von Pectolinarin, identisch ist.



(XXII) Scutellarein



(XXIII) Scutellarein-6,4'-Methyläther,
Pectolinarigenin

1931 isolierten L. SCHMID und W. RUMPEL⁷⁰ Pectolinarin aus den Blüten von *Linaria vulgaris* als "Anthochlor" von *Linaria vulgaris*, stellten für das Glykosid und das Aglukon die Bruttoformeln auf und fanden als Zuckerkomponente eine Hexose und eine Methylpentose.

68) T. KLOBB, Compt. rend. d. s. Acad. Sci. 145, 331 (1907)

69) F. WESSELY, G.H. MOSER, Monatsh. Chem. 56, 97 (1930)

70) L. SCHMID, W. RUMPEL, Monatsh. Chem. 57, 421 (1931)

Dieselben Autoren⁷¹ ermittelten im Jahre 1932 die Konstitution des Farbstoffes der Leinkrautblüten. Die Arbeit von T. KLOBB⁷² war ihnen damals offenbar nicht bekannt. Auch entging ihnen völlig das Vorhandensein des zweiten Glykosides, des Linarins.

1936 klärten K. W. MERZ und Y. H. WU⁷³ die Konstitution der beiden Glykoside Linarin und Pectolinarin völlig auf. Sie wiesen gleichzeitig nach, dass das Linarigenin, das Aglukon des Linarins, mit Acacetin identisch ist.

Schliesslich isolierte im Jahre 1937 G. ZEMPLEN⁷⁴ aus dem ganzen Kraut von *Linaria vulgaris* neben Linarin und Pectolinarin noch ein drittes Flavonglykosid, das Neolinarin. Neolinarin ist in seiner Konstitution mit Pectolinarin identisch und nach G. ZEMPLEN⁷⁴ höchstwahrscheinlich die "kristallisierte Form des Pectolinarins". Neolinarin konnte durch Einwirkung von Alkali in Pectolinarin umgewandelt werden. Der umgekehrte Vorgang gelang G. ZEMPLEN⁷⁴ nicht. Bei unseren Isolierungsarbeiten wurde das Pectolinarin als gallertiger Niederschlag nach der Methanoleluation über Polyamidsäulen in die Kristallform umgewandelt. Vor und nach der Säuleneluation war die Substanz chromatographisch rein. Die Originalarbeit von G. ZEMPLEN⁷⁴ wurde 1942 von G. ZEMPLEN, R. BOGNAR und L. MESTER⁷⁵ in deutscher Sprache veröffentlicht.

1943 gelang G. ZEMPLEN und L. FARKAS⁷⁶ die Total-Synthese von Linarin und Pectolinarin, nachdem G. ZEMPLEN und R. BOGNAR⁷⁷ schon 1941 die Synthese aus den Aglukonen und Rutinose durchgeführt hatten.

1950 führten V. V. SREERAMA-MURTI und T. R. SESHADRI⁷⁸ den völligen Strukturbeweis und die indirekte Synthese des Pectolinarins durch und beschrieben eine genaue Synthese.

1955 isolierten T. NAKAOKI und Mitarbeiter⁷⁹ das Pectolinarin aus den Blättern von *Linaria japonica*.

71) L. SCHMID, W. RUMPEL, Monatsh. Chem. 60, 8 (1932)

72) T. KLOBB, Compt. rend. d. s. Acad. Sci. 145, 331 (1907)

73) K. W. MERZ, Y. H. WU, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharm. Ges. 274/46, 126 (1936)

74) G. ZEMPLEN, Math. Nat. Anz. Ung. Akad. Wiss. Budapest 55, 652 (1937)

75) G. ZEMPLEN, R. BOGNAR, L. MESTER, Chem. Ber. 75, 489 6 (1942)

76) G. ZEMPLEN, L. FARKAS, Chem. Ber. 76, 937 (1943)

77) G. ZEMPLEN, R. BOGNAR, Chem. Ber. 74, 1818 (1941)

78) V. V. SREERAMA-MURTI, T. R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci. 30 A, 78 (1949), ref. Chem. Abstr. 44, 3987 (1950)

79) T. NAKAOKI, N. MORITA, H. MOTOTSUME, A. HIRAKI, T. TAKEUCHI, J. Pharm. Soc. Japan 75, 171 (1955), ref. Chem. Abstr. 49, 8562 (1955)

Das Aglukon des Linarins, das Acacetin, wurde schon 1900 zum ersten Male aus *Robinia pseudacacia* isoliert⁸⁰. Weitere Untersuchungen folgten 1925⁸¹ und dann erst wieder 1953⁸².

Auch in anderen Pflanzen wurden Acacetin bzw. Acacetin-Glykoside gefunden, so in *Buddleia variabilis* Hemse als Buddleflavonolosid^{83,84}, ausserdem in *Ammi visnaga*⁸⁵.

Die Synthese von Linarin gelang 1926 R. ROBINSON und Mitarbeitern⁸⁶.

80) A. G. PERKIN, J. Chem. Soc. 77, 423 (1900)

81) S. HATTORI, Acta phytochimic. Japan 2, 99 (1925)

82) K. NAKAZAWA, S. MATSUURA, J. Pharm. Soc. Japan 73, 481 (1953), ref. Chem. Abstr. 48, 3357 (1954)

83) M. H. YÜ, Bull. Soc. Chim. biol. 15, 482 (1933)

84) W. BAKER, R. HEMMING, W. D. OLLIS, J. Chem. Soc. 691 (1951)

85) A. J. COREIA RALPHA, Rev. port. farm. 2, 54 (1952), ref. Chem. Abstr. 48, 2696 (1954)

86) R. ROBINSON, K. VENKATARAMAN, J. Chem. Soc. 2344 (1926)

C. Experimenteller Teil

1. Isolierungsverfahren an der Polyamidsäule

a) Isolierung von Glykosid A und B aus *Cirsium oleraceum* (Compositae)

Wir sammelten das gesamte Kraut von *Cirsium oleraceum* und verwendeten die getrockneten Blätter.

400 g getrocknete Blätter zerkleinerten wir und extrahierten sie im Soxhlet-apparat mit etwa 10 l Methanol zwei Tage lang in mehreren Anteilen. Aus diesem methanolischen Extrakt fiel ein graugrüner Niederschlag aus, der sich chromatographisch als Mischkristallisat aus Glykosid A und B erwies. Um das Rohkristallisat vom anhaftenden Chlorophyll und auch anderen lipophilen Ballaststoffen, wie z.B. Pflanzenfetten zu reinigen, gaben wir es in eine Zellulosehülse und extrahierten es im Soxhletapparat mit Chloroform bis zur Farblosigkeit des Lösungsmittels im Steigrohr. Die Ausbeute an vorgereinigtem Rohkristallisat betrug 10% des Ausgangsmaterials.

Wir verwendeten etwa 2 g Rohkristallisat zur Isolierung der Glykoside A und B und etwa 2 g nach Hydrolyse mit 10% Schwefelsäure zur Isolierung der Aglukone A und B.

Die Lösung der Glykoside A und B aus dem Rohkristallisat gaben wir auf eine Polyamidsäule, die wir mit Methanol eingeschlämmt hatten. Die Höhe der Säule betrug 1.5 m und ihr Durchmesser 10 cm. Wir verwendeten dabei ein Polyamidpulver der Firma Badische Anilin- und Sodafabrik K.G., Ludwigshafen/Rhein, das unter der Bezeichnung Ultramid-Pulver K 228/BM 2 im Handel ist. Wir eluierten mit Methanol bei Zimmertemperatur.

Im UV-Licht war das Wandern der Glykoside A und B als einheitliche braune Zone zu verfolgen. Eine Auftrennung in Zonen war nicht sichtbar. Das Eluat fingen wir in Fraktionen zu je 100 ml auf. Wir eluierten solange, bis das Eluat farblos war.

Die einzelnen Fraktionen chromatographierten wir im Laufmittel IAW absteigend. Da sich Glykosid A und B deutlich durch ihre R_f -Werte und Fluoreszenzfarben im UV-Licht nach dem Besprühen mit Aluminiumsulfatlösung unterscheiden, liess sich der Gehalt der einzelnen Fraktionen gut feststellen.

Die Fraktionen gleichen Inhaltes wurden vereinigt, das Methanol abdestilliert und die Glykoside A und B aus Methanol auskristallisiert. Die Mischfraktionen wurden gleichfalls vereinigt, eingeengt und erneut über die Polyamidsäule gegeben.

In den ersten Fraktionen erschien das reine Glykosid A mit grüngelber Farbe. Die folgenden Fraktionen bestanden aus einer Mischung von Glykosid A und B. Dann trat das Glykosid B in reinen Fraktionen mit goldgelber Farbe auf. Um die restlichen Flavone aus der Säule herauszuwaschen, waren noch 1.5 l Methanol notwendig. Auf der Säule war bereits im UV-Licht und im Tageslicht keine Färbung mehr zu beobachten.

In den ersten beiden konzentrierten Fraktionen von Glykosid A kristallisierte über Nacht das Glykosid in grünlichweissen, stern- und sonnenförmigen Kristallen aus.

Bei diesem Eluationsverfahren an der Polyamidsäule mit Methanol konnten gleichzeitig in einem Arbeitsgang in Abständen von 50 cm je 100 ml Lösungsgemisch aus Glykosid A und B auf der Säule wandern.

Dazu lösten wir etwa 50 mg Rohkristalliat von Glykosid A und B in 100 ml heissem Methanol und gaben diese Lösung vorsichtig auf die Polyamidsäule. Dann öffneten wir den Tropfhahn und liessen pro Sekunde einen Tropfen abtropfen. Nachdem das Lösungsmittelgemisch ganz an die Polyamidsäule absorbiert war, füllten wir das obere Viertel der Säule, das nicht mit Polyamidpulver gefüllt worden war, mit Methanol auf und eluierten die Säule. Nachdem die Front der Lösung etwa 40 cm gewandert war, beschickten wir die Säule erneut mit einer Lösung von 50 mg Glykosid A und B in 100 ml heissem Methanol und liessen weiter abtropfen. Sobald die ersten Fraktion von Glykosid A der ersten Lösung abtropfte, gaben wir die dritten 100 ml methanolischer Lösung von 50 mg Glykosid A und B auf die Säule.

Auf diese Weise konnten wir bei einer einmaligen Füllung der Säule mit etwa 1 kg Polyamidpulver durch Eluation mit insgesamt 60-100 l Methanol die grosse Säule 30mal zur Trennung des Glykosidgemisches A und B verwenden. Das Polyamidpulver liess dabei in seiner Trennfähigkeit nur geringfügig nach. Das Methanol gewannen wir durch Einengen der Fraktionen zurück und verwendeten es immer wieder.

Wir isolierten 1.5 g Glykosid A, was einer Ausbeute von 0.35% entsprach. Da wir jedoch nur 2 g der 40 g Rohkristalliat zur Isolierung verwendet hatten, betrug die tatsächliche Ausbeute 7%. Die Ausbeute von 30 mg Glykosid B entsprach 1.5%.

b) Isolierung von Glykosid C aus *Trifolium campestre* (Papilionaceae)

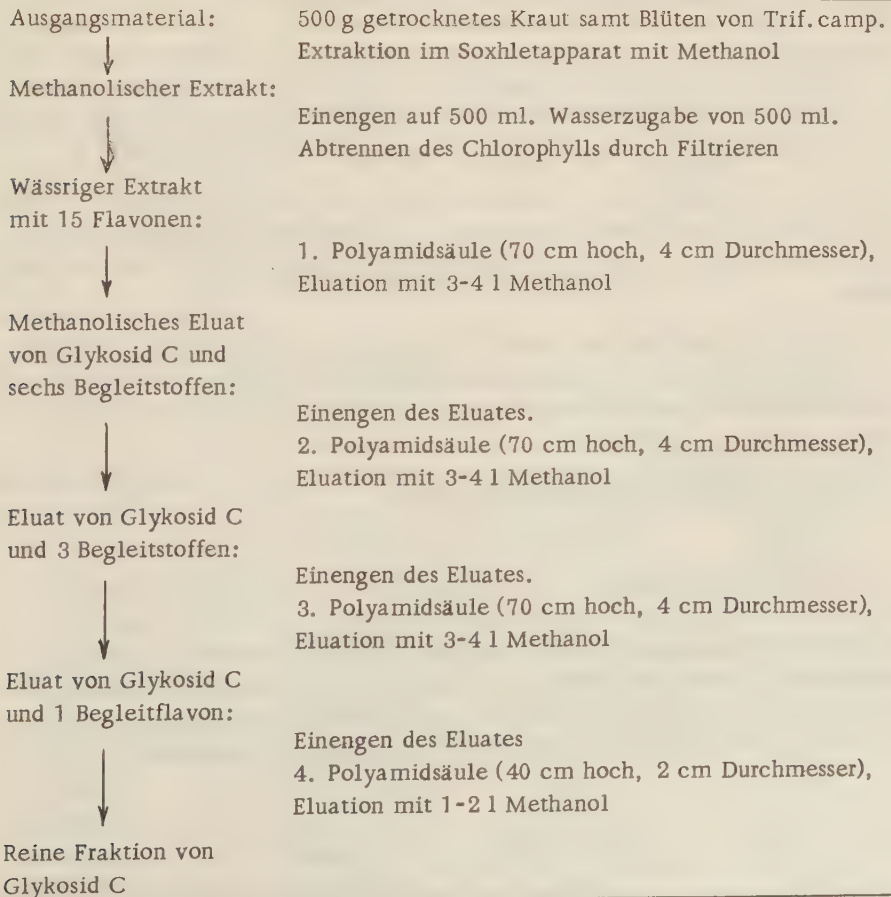
Aus 500 g getrocknetem Kraut von *Trifolium campestre* stellten wir einen chlorophyllfreien Extrakt her.

Beim Betrachten des Papierchromatogrammes unter dem UV-Licht waren 15 Flavoninhaltsstoffe zu erkennen, die vom Startpunkt bis zur Front des Chromatogramms angereicht waren. Wahrscheinlich waren jedoch noch mehr Flavone enthalten und nur von den anderen auf dem Chromatogramm überdeckt.

Das zu isolierende Glykosid C mit demselben R_f -Wert wie Glykosid B aus *Cirsium oleraceum* isolierten wir wieder nach der bewährten Methode der Säulenuelution mit Methanol über Polyamidpulver. Wegen der grossen Anzahl der Begleitstoffe mussten wir das Gemisch über mehrere Säulen geben, bis wir zu der gewünschten reinen Fraktion von Glykosid C gelangten. Fraktionen, die kein Glykosid C enthielten, wurden verworfen.

Den Isolierungsgang haben wir im folgenden schematisch dargestellt:

Abb. 17 Isolierungsschema von Glykosid C



Glykosid C kristallisierte aus der reinen Fraktion gut aus. Durch Umkristallisation erhielten wir ca. 1 g Glykosid C in feinen gelblichweissen Nadeln, was einer Ausbeute von 0.5% entsprach.

c) Isolierung von Linarin und Pectolinarin aus *Linaria vulgaris*

Aus 25 g getrocknetem Kraut von *Linaria vulgaris* stellten wir mit 2 l Methanol im Soxhletapparat einen methanolischen Extrakt her. Nach Abdestillieren des Methanols auf 50 ml gaben wir 100 ml Wasser zu, verdampften das restliche Methanol auf dem Wasserbade und filtrierten den Chlorophyllniederschlag ab. Die papierchromatographische Untersuchung des wässrigen Filtrates zeigte die Flavoninhaltsstoffe Linarin und Pectolinarin als zwei braune Flecke mit den R_f -Werten 0.75 und 0.85 im Laufmittel IAW, wobei der eine Fleck mit dem R_f -Wert 0.75 mit Aluminiumsulfatlösung besprüht unter dem UV-Licht eine gelbe Fluoreszenz zeigte.

Die Isolierung von Linarin und Pectolinarin führten wir in gleicher Weise, wie die Trennung von Glykosid A und B durch. Dazu gaben wir den wässrigen Extrakt von 100 ml auf eine Polyamidsäule von 50 cm Höhe und 5 cm Durchmesser, eluierten sie mit Methanol und fingen das Eluat in Fraktionen zu je 25 ml auf.

Schon im ersten Durchlauf konnten wir reine Fraktionen von Pectolinarin erhalten, das zuerst aus der Säule eluiert wurde. Zur Darstellung des Linarins musste noch zweimal die Polyamidsäule mit Linarin angereicherten Fraktionen beschickt werden.

Die beiden Flavonglykoside wurden aus Methanol umkristallisiert. Wir isolierten 50 mg Pectolinarin, was einer Ausbeute von 0.2% entsprach, und 1 mg Linarin, was einer Ausbeute von 0.004% entsprach.

2. Papierchromatographische Untersuchungen

a) R_f -Werte

Wir chromatographierten die Flavonglykoside und ihre Aglukone bei Zimmertemperatur auf dem Chromatogrammpapier der Firma Schleicher u. Schüll, Nr. 2043 b G1 im absteigenden Verfahren in den beiden Laufmitteln Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2+5+5) und der hydrophoben Phase von Butanol-Eisessig-Wasser (5+1+4). Die R_f -Werte haben wir auf mehreren Chromatogrammen gemessen und deren Mittelwerte nachstehend tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle 6
R_f-Werte der Glykoside

	IAW	BEW
Glykosid A	0.85	0.55
Glykosid B	0.75	0.50
Glykosid C	0.85	0.55
Pectolinarin	0.85	0.55
Linarin	0.70	0.50

Tabelle 7
R_f-Werte der Aglukone

	IAW	BEW
Aglukon A	0.55	0.90
Aglukon B	0.50	0.90
Aglukon C	0.55	0.90
Pectolinarigenin	0.55	0.90
Linarigenin	0.50	0.90

b) Fluoreszenzfarben im UV-Licht

Die Farbflecke auf den Chromatogrammen betrachteten wir unter dem UV-Licht der Analysenquarzlampe unbesprüht und nach dem Besprühen mit 5% wässriger Aluminiumsulfat-Lösung und einer basischen Bleiazetat-Lösung in der Konzentration des Liquor Plumbi subacetici DAB 6. Die Farberscheinungen auf dem Chromatogramm haben wir tabellarisch zusammengefasst:

Tabelle 8
Fluoreszenzfarben der Glykoside

	unbesprüht	Alum. sulf.	bas. Bleiazetat
Glykosid A	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Glykosid B	dunkelbraun	gelb	gelb
Glykosid C	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Pectolinarin	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Linarin	dunkelbraun	gelb	gelb

Tabelle 9
Fluoreszenzfarben der Aglukone

	unbesprüht	Alum. sulf.	bas. Bleiazetat
Aglukon A	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Aglukon B	dunkelbraun	gelb	gelb
Aglukon C	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Pectolarigenin	dunkelbraun	dunkelbraun	braun
Linarigenin	dunkelbraun	gelb	gelb

3. Chemische Untersuchungen

a) Farbreaktionen

Reduktionstest nach WILLSTÄTTER

Für die Durchführung des Reduktionstestes nach Willstätter verweisen wir auf die Originalliteratur⁸⁷ und auf ausführliche Arbeiten, die am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre in München durchgeführt wurden^{88, 89, 90}.

Molisch-Reaktion

0.5 ml der methanolischen Lösung der Glykoside und Aglukone versetzten wir mit 2 Tropfen einer 15% alkoholischen Lösung von α -Naphthol und unterschichteten die Mischung vorsichtig mit 1 ml konz. Schwefelsäure. Bei Anwesenheit von Kohlenhydraten, also Zuckern oder auch Glykosiden, entstand an der Berührungsstelle ein violettbrauner Ring. Beim Durchmischen der Flüssigkeiten nahm die Lösung eine dunkelrote Farbe an.

Briggs- und Locker-Test⁹¹

1 ml der methanolischen Lösung der Glykoside und Aglukone versetzten wir mit 1 Tropfen einer 0.1% wässrigen Eisenchloridlösung. Die Lösungen färbten sich meist braun an. Dann gaben wir 2 Tropfen verdünnte Salzsäure zu und neutralisierten wieder mit Natriumazetat. Die Färbungen waren sehr konzentrationsabhängig und oft nicht sehr markant.

87) R. WILLSTÄTTER, H. MALLISON, S.B. preuss. Akad. Wiss. phys. math. Kl. 769 (1914)

88) L. STICH, Dissertation München November 1958

89) F. GLOGGENGIESER, Dissertation München Juni 1957

90) R. SEMRAU, Dissertation München März 1958

91) L. H. BRIGGS, R. H. LOCKER, J. Chem. Soc. (London) 3131 (1951)

Zirkon-Zitronensäure-Sprühtest

Für die Durchführung des Zirkon-Zitronensäure-Testes als Sprühtest und im Reagenzglas verweisen wir auf die Originalliteratur^{92,93} und auf Arbeiten am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre in München^{94,95,96}.

92) L. HÖRHAMMER, R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.
184/56, 276 (1951)

93) L. HÖRHAMMER, K. H. MÜLLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.
287/59, 310 (1954)

94) L. STICH, Dissertation München November 1958

95) R. SEMRAU, Dissertation München März 1958

96) W. KIRMAYER, Dissertation München März 1959

Zusammenfassung

Die Farbtaste führten wir zunächst nur dort durch, wo sie als orientierende Hinweise notwendig waren. Zum Vergleich stellten wir sie nach Isolierung sämtlicher Glykoside und Aglukone zusammen (Tab. 10). Die Farberscheinungen waren nicht immer sehr gut ausgeprägt.

Tabelle 10

Farbreaktionen der Glykoside und Aglukone

	Redukt. Test	Molisch-Reaktion	Briggs-Locker-Test			Zirkon-
	Zn/HCl		FeCl ₃	HCl	Na-azet.	Zitr. Test
Glykosid A	karminrot	+	braun	grün	braun	-
Glykosid B	karminrot	+	gelb	gelb	gelb	-
Glykosid C	karminrot	+	braun	grün	braun	-
Pectolinarin	karminrot	+	braun	grün	braun	-
Linarin	0	0	0	0	0	0
Aglukon A	karminrot	-	braun-violett	grün	braun-violett	-
Aglukon B	orangerot	-	braun	grün	braun	-
Aglukon C	karminrot	-	braun-violett	grün	braun-violett	-
Pectolinarigenin	karminrot	-	braun-violett	grün	braun-violett	-
Linarigenin	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = positive Reaktion
 - = negative Reaktion
 0 = keine Reaktion durchgeführt, da zu wenig Substanz verfügbar.

b) Darstellung der Aglukone

Das Glykosid trockneten wir bis zur Gewichtskonstanz und versetzten die quantitativ eingewogene Substanz im Hydrolysenkölbchen mit 10 ml 20% Schwefelsäure und 10 ml Methanol. Die Lösung hielten wir 3 Stunden am Rückflusskühler in gelindem Sieden über der Sparflamme des Bunsenbrenners. Dabei ging das nur teilweise gelöste Glykosid in Lösung.

Nach Abdampfen des Methanols auf dem Wasserbade fiel nach einstündigem Stehen im Kühlschrank das Aglukon aus, das wir auf eine Mikronutsche brachten und mit Wasser bis zur Säurefreiheit auswuschen. Nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz wogen wir das Aglukon quantitativ aus, lösten es mit heissem Methanol von der Mikronutsche und kristallisierten es aus Methanol um.

Nach dieser Methode erhielten wir im einzelnen folgende Ergebnisse:

Tabelle 11

Auswertung der quantitativen Hydrolyse der Glykoside

Glykosid	Einwaage mg	Auswaage mg	% Aglukon	
			gef.	ber.
Glykosid A	144.2	73.9	51.2	50.4
Glykosid B	26.4	14.8	56.0	47.9
Glykosid C	42.0	21.8	51.9	50.4

Bei Linarin und Pectolarin führten wir nur qualitative Hydrolysen durch.

c) Zuckeranteil

Das saure Filtrat und das Waschwasser der Aglukone neutralisierten wir mit Barytwasser, filtrierten den Niederschlag von Bariumsulfat ab und engten die Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf 2 ml ein. Die Neutralisation der sauren Zuckerlösung führten wir auch mit Ionenaustauscher durch, ein Verfahren, das bei gleichen Ergebnissen etwas umständlicher ist. Die Fehling'sche Probe auf Zucker war positiv.

Entwickeln des Papierchromatogramms mit Anilinphthalat

Zum Nachweis der Zuckerart trugen wir die Lösung zusammen mit Testlösungen auf ein Papierchromatogramm auf und entwickelten in der hydrophoben Phase des Laufmittels Pyridin-Äthylazetat-Wasser (1+2+2) absteigend. Das getrocknete Chromatogramm besprühten wir mit einer Lösung von 1.66 g Phthalsäure und 0.93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol und erhitzen es eine Viertelstunde lang im Trockenschrank auf 105°. Die Zucker traten als braune Flecke auf. Glukose erschien als dunkelbrauner, Rhamnose als rotbrauner Fleck. R_f -Wert Glukose 0.50, R_f -Wert Rhamnose 0.66.

Entwickeln des Papierchromatogramms mit Silbernitrat

Das getrocknete Chromatogramm der Zuckerlösungen besprühten wir mit einer Lösung von 0.85 g Silbernitrat und 4.0 g Natriumhydroxyd in 25 ml 25% Ammoniak

und 75 ml Wasser. Noch feucht hielten wir das Chromatogramm über ein Dampfbad. Dabei wurde an den Stellen, an denen sich die Zucker befanden, das Silbernitrat zu Silber reduziert. Es trat ein schwarzer Fleck auf. Das nichtreduzierte Silbernitrat lösten wir durch Eintauchen des Chromatogramms in ein Bad von 10% Natriumthiosulfatlösung heraus. Auf diese Weise wurden die schwarzen Flecke des reduzierten Silbers fixiert.

Gärung

2 ml der Zuckerlösung versetzten wir im Reagenzglas mit 0.5 g Presshefe. Schon nach kurzer Zeit trat Blasenbildung auf, die durch die Gärung hervorgerufen worden war. Nach eintägigem Stehen zentrifugierten wir die Lösung. Auf dem Chromatogramm trat in allen durchgeführten Versuchen mit den Sprühreagentien Anilinchlorid und Silbernitrat nur noch ein Fleck auf, der auf Grund seiner Laufhöhe der Rhamnose zugeordnet werden konnte.

Osazon

Die von Glukose durch Gärung befreite Zuckerlösung engten wir auf 0.5 ml ein und versetzten sie in einem Zentrifugenglas mit gleichem Volumen einer frisch bereiteten Lösung von 1.0 g Phenylhydrazinchlorid und 1.5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser. Das Glas erhitzen wir 1 Stunde im Wasserbad. Nach dem langsamen Erkalten zentrifugierten wir den hellgelben Niederschlag ab, wuschen ihn mit Wasser aus und trockneten ihn. Smp. 190°. Mischschmelzpunkt mit aus authentischer Rhamnose hergestelltem Rhamnosazon (Smp. 188°).

Die unvergorene Zuckerlösung versetzten wir mit dem gleichen Volumen der Phenylhydrazinlösung und hielten sie 1 Stunde im siedenden Wasserbade. Das ausgefallene Mischosazon filtrierten wir ab, trockneten es und versetzten es vorsichtig mit 1 ml Azeton. Dabei löste sich das Rhamnosazon, während das Glukosazon unlöslich blieb. Aus der Azetonlösung gewannen wir durch Abdunsten des Azetons das Rhamnosazon. Die Schmelzpunkte der Osazone stimmten mit den Literaturschmelzpunkten überein.

Zusammenfassung

In allen untersuchten Zuckerlösungen aus der Hydrolyse von Glykosid A, B, C, Pectolinarin und Linarin konnten wir chromatographisch Glukose und Rhamnose auf Grund derselben R_f -Werte mit den Testlösungen feststellen. Der Gärversuch gelang in allen Fällen. Die Osazone konnten wir nur in den Zuckerlösungen aus der Hydrolyse von Glykosid A, B und C darstellen.

d) CH_2 - und CH_3O -Bestimmungen

Die vom mikroanalytischen Laboratorium im Max Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim Ruhr durchgeführten Mikroanalysen ergaben in ihren gefundenen Werten gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten (Tab. 12 u. 13).

Tabelle 12
Mikroanalytische Bestimmungen der Glykoside A, B und C

<u>Glykosid A</u>					
$C_{29}H_{34}O_{15}$ (622)					
Einwaage	CO_2	H_2O	% C	% H	
mg	mg	mg			
4.173	8.51	2.03	gef. 55.65	5.44	
-	-	-	ber. 55.95	5.46	
Einwaage	ccm n/50 $Na_2S_2O_3$		% CH_3O		
mg					
3.365	3.42		gef. 10.52		
-	-		ber. 9.97		
<u>Glykosid B</u>					
$C_{28}H_{32}O_{14}$ (592)					
Einwaage	CO_2	H_2O	% C	% H	
mg	mg	mg			
3.381	6.79	1.70	gef. 54.81	5.63	
-	-	-	ber. 56.75	5.40	
Einwaage	ccm n/50 $Na_2S_2O_3$		% CH_3O		
mg					
3.668	2.23		gef. 6.29		
-	-		ber. 5.24		
<u>Glykosid C</u>					
$C_{29}H_{34}O_{15}$ (622)					
Einwaage	CO_2	H_2O	% C	% H	
mg	mg	mg			
3.621	7.41	1.82	gef. 55.85	5.62	
-	-	-	ber. 55.95	5.46	
Einwaage	ccm n/50 $Na_2S_2O_3$		% CH_3O		
mg					
4.611	4.42		gef. 9.92		
-	-		ber. 9.97		
Einwaage	Verseif. Mittel	Verseif. Dauer	ml n/100 NaOH	% CH_3CO	
mg					
1. 2.496	n/1 meth.KOH	90 Min.	0.00	0.00	
2. 4.734	n/1 meth.KOH	90 Min.	0.00	0.00	

Tabelle 13
Mikroanalytische Bestimmungen der Aglukone A, B und C

<u>Aglukon A</u>	$C_{17}H_{14}O_6$ (314)				
	Einwaage	CO ₂	H ₂ O	% C	% H
	mg	mg	mg		
	2.716	6.43	1.15	gef. 64.61	4.74
	-	-	-	ber. 64.96	4.46
	Einwaage	ccm n/50 Na ₂ S ₂ O ₃		% CH ₃ O	
mg					
1.790	4.23		gef. 24.46		
-	-		ber. 19.75		
<u>Aglukon B</u>	$C_{16}H_{12}O_5$ (284)				
	Einwaage	CO ₂	H ₂ O	% C	% H
	mg	mg	mg		
	1.837	1.58	0.81	gef. 68.04	4.93
	-	-	-	ber. 67.61	4.22
	Einwaage	ccm n/50 Na ₂ S ₂ O ₃		% CH ₃ O	
mg					
1.253	1.30		gef. 10.74		
-	-		ber. 10.91		
<u>Aglukon C</u>	$C_{17}H_{14}O_6$ (314)				
	Einwaage	CO ₂	H ₂ O	% C	% H
	mg	mg	mg		
	3.868	9.24	1.60	gef. 65.19	4.63
	-	-	-	ber. 64.96	4.46
	Einwaage	ccm n/50 Na ₂ S ₂ O ₃		% CH ₃ O	
mg					
4.507	7.93		gef. 18.21		
-	-		ber. 19.75		

e) Entmethylierung

Durchführung

Etwa 50 mg Aglukon versetzten wir mit 3 ml 70% Jodwasserstoffsäure, 0.5 ml Phenolum liquefactum DAB 6 und 0.5 ml Essigsäureanhydrid. Das Entmethylierungskölbchen besitzt zwei Öffnungen. Durch die eine Öffnung leiteten wir einen gleichmässigen Strom von CO_2 . Die andere Öffnung trägt einen Rückflusskühler. Auf dem Paraffinbad erhitzen wir das Gemisch bei 150° zwei Stunden lang. Dann gossen wir das noch heisse Reaktionsgemisch in Eiswasser und liessen es eine Stunde im Kühlschrank stehen. Den schwarzen Niederschlag filtrierten wir ab, wuschen ihn mit Wasser und lösten ihn im Methanol. Die Lösung war von schwarzgrüner Farbe.

Glykosid A

Das Entmethylierungsprodukt des Aglukons A konnte auf Grund seines Papierchromatogramms dem Scutellarein zugeordnet werden.

Tabelle 14

Papierchromatographisches Verhalten

	IAW	BEW	unbesprüht	Alum. sulf.	bas. Bleiaz.	Barytwasser
Entmeth. prod.	0.35	0.80	braun	braun	braun	grün
Scutellarein	0.35	0.80	braun	braun	braun	grün

Die Ausbeute betrug nach mehreren Umkristallisationsversuchen aus Methanol etwa 1 mg. Smp. des Entmethylierungsproduktes $335-345^\circ$. Smp. von Scutellarein $330-350^\circ$. Das UV-Spektrum zeigte dieselben Maxima wie Scutellarein.

Tabelle 15

UV-Maxima

	1. Max.	2. Max.
Entmethylierungsprodukt	290 m μ	340 m μ
Scutellarein	290 m μ	340 m μ

Glykosid B

Das Entmethylierungsprodukt von Aglukon B zeigte auf dem Papierchromatogramm einen deutlich markierten Fleck, den wir auf Grund seines R_f -Wertes und seiner Fluoreszenzfarben im UV-Licht dem Apigenin zuordnen konnten.

Tabelle 16

Papierchromatographisches Verhalten

	R_f -Werte		Fluoreszenzfarben im UV-Licht		
	IAW	BEW	unbesprüht	Alum. sulf.	bas. Bleiaz.
Entmeth. prod.	0.45	0.90	braun	gelb	gelb
Apigenin	0.45	0.90	braun	gelb	gelb

Da das Entmethylierungsprodukt auch nach mehreren Versuchen aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht auskristallisierte, obwohl die Lösung chromatographisch rein war, gaben wir die methanolische Lösung über eine kleine Polyamidsäule von 30 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Eluiermittel war Methanol. Aus dem gelben Eluat kristallisierte nach dem Einengen das Entmethylierungsprodukt in gelben Nadeln aus. Smp. bei 250° unter Zersetzung. Smp. von Apigenin = $246-248^{\circ}$.

Die mikroanalytischen Bestimmungen ergaben folgende Ergebnisse:

Tabelle 17

CH-Bestimmung

Entmethylierungsprodukt					
<u>Apigenin</u>	$C_{15}H_{10}O_6$ (270)				
	Einwaage	CO_2	H_2O	% C	% H
	mg	mg	mg		
	1.490	3.45	0.66	gef. 63.19	4.96
	-	-	-	ber. 66.67	3.70

f) Methylierung

50 mg Substanz lösten wir durch gelindes Erwärmen in 75 ml wasserfreiem Aceton. Zu der Lösung gaben wir 2.0 g Kaliumbikarbonat und 2 ml Dimethylsulfat. Die Mischung wurde eine Stunde geschüttelt. Auf dem elektrisch beheizten Heizpilz hielten wir die Lösung 30 Stunden lang im schwachen Sieden am

Rückflusskühler, dessen obere Öffnung mit Kalziumchlorid versehen war, um den Zutritt von Luftfeuchtigkeit zu verhindern.

Nach dem Erkalten filtrierten wir das ausgefallene Kaliumsulfat ab, gaben zu dem Filtrat 10 ml Wasser und destillierten das Aceton auf dem Wasserbade ab. Dabei fiel das Methylprodukt aus. Den Niederschlag filtrierten wir ab, wuschen ihn mit Wasser nach und lösten ihn in Methanol auf.

Bei den Methylprodukten der Glykoside gaben wir diese methanolische Lösung in ein Hydrolysenkölbchen, versetzten es mit demselben Volumen 20% Schwefelsäure und hydrolysierten es am Rückflusskühler zwei Stunden lang. Das Hydrolysat verarbeiteten wir auf die bei der Darstellung der Aglukone beschriebenen Art.

Die Methylprodukte kristallisierten wir aus Methanol um. Waren sie sehr unreinigt, so gaben wir sie in methanolischer Lösung zur Reinigung über eine kleine Polyamidsäule, die wir mit Methanol eluierten. Durch diese Reinigungsmethode erhielten wir in allen Fällen weisse, schmelzpunktreine, gut kristallisierende Methylprodukte.

Die Methoxylgruppenbestimmungen der Methylderivate ergaben im einzelnen folgende Ergebnisse:

Tabelle 18

Methoxyl-Gruppenbestimmungen der Methylderivate

	Einwaage mg	ccm n/50 Na ₂ S ₂ O ₃	% CH ₃ O
Glykosid A	1.223	3.49	gef. 29.54
	-	-	ber. 28.35
Aglukon A	4.075	14.20	gef. 36.07
	-	-	ber. 36.26
Glykosid B	0.597	1.05	gef. 18.20
	-	-	ber. 20.80
Aglukon B	3.587	6.77	gef. 19.53
	2.346	4.32	gef. 19.06
	2.766	4.02	gef. 15.04
	-	-	ber. 20.18
			auf 2 CH ₃ O
	-	-	ber. 29.80
			auf 3 CH ₃ O

g) Azetylierung

20 mg Substanz versetzten wir mit 2 ml Essigsäureanhydrid, 5 Tropfen Pyridin und 0,2 g frisch geschmolzenen wasserfreien Natriumazetat. Die Mischung hielten wir am Rückflusskühler zwei Stunden lang auf der Sparflamme des Bunsenbrenners im gelinden Sieden. Das farblose Reaktionsgemisch versetzten wir nach dem Abkühlen mit 50 ml Wasser und stellten es drei Stunden lang in den Kühlschrank. Den Niederschlag nutschten wir auf einer Mikronutsche ab. Nach dem Waschen bis zur Säurefreiheit kristallisierten wir die Azetylprodukte aus Methanol/Wasser um.

Die mikroanalytischen Bestimmungen der Azetylprodukte von Glykosid und Aglukon A ergaben keine Übereinstimmung der berechneten und gefundenen Werte, obwohl die Azetylprodukte schmelzpunktrein waren und auf dem Papierchromatogramm einen einheitlichen blauen Fleck zeigten. Wir führten je zwei Bestimmungen durch.

Tabelle 19
CH₃CO-Bestimmungen

	Einwaage mg	Verseif. Mittel	Vers. Dauer	ccm n/100 NaOH	% CH ₃ CO
Azetat von:					
Glykosid A	2,300	n/1 meth. KOH	90 Min.	1,46	gef. 27,32
	5,156	n/1 meth. KOH	90 Min.	3,37	gef. 28,08
	-	-	-	-	ber. 32,86
Azetat von:					
Aglukon A	2,961	n/1 meth. KOH	90 Min.	0,71	gef. 10,32
	4,783	n/1 meth. KOH	90 Min.	1,82	gef. 16,38
	-	-	-	-	ber. 21,61

h) Alkalispaltung

Durchführung

100 mg Aglukon versetzten wir mit 5-10 ml 25% wässriger Kalilauge und erhitzen das Gemisch am Rückflusskühler zwei Stunden lang auf der Flamme des Bunsenbrenners. Durch das Gemisch leiteten wir einen CO₂-Strom, um eine mögliche Oxydation zu verhindern. Das erkaltete Reaktionsgemisch, das sich im Laufe der Reaktion von gelb nach braun verfärbt hatte, verdünnten wir mit 100 ml Wasser und säuerten es mit Salzsäure an.

Die Lösung wurde dreimal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung engten wir auf etwa 100 ml auf dem Dampfbade ein und schüttelten sie zweimal mit je 100 ml einer 5% Natriumbikarbonatlösung aus.

Die zurückbleibende Ätherlösung enthielt den phenolischen Anteil der Abbauprodukte der Alkalispaltung. Den Äther destillierten wir ab und lösten den Rückstand in Methanol.

Die wässrige Natriumbikarbonatlösung enthielt den sauren Anteil der Abbauprodukte der Alkalispaltung. Nach dem Ansäuern der Lösung mit Salzsäure schüttelten wir sie dreimal mit je 300 ml Äther aus, dampften den Äther auf dem Dampfbad ab und nahmen den Rückstand in Methanol auf.

Die methanolischen Lösungen des Säure- und Phenolanteils chromatographierten wir.

Entwickeln der Chromatogramme

Die getrockneten Chromatogramme besprühten wir zunächst mit einer 1% wässrigen Eisenchlorid-Lösung. Dabei färben sich phenolische Bestandteile braun, violett oder grün. Es trat jedoch bei den Abbauprodukten von Aglukon A und B kein solcher Fleck auf dem Chromatogramm auf, da Anissäure keine freien OH-Gruppen besitzt.

Beim Besprühen der Chromatogramme mit diazotierter Sulfanilsäure⁹⁷ konnten wir nur im phenolischen Anteil der Alkalispaltung von Aglukon A einen braunen Farbfleck erhalten, den wir auf Grund seines R_f -Wertes keinem der üblichen Phenolkörper zuordnen konnten.

Hierfür besprühten wir die Chromatogramme nach dem Trocknen zuerst mit einer Mischung gleicher Teile, einer 1% Lösung von Sulfanilsäure in n/l Salzsäure und einer 1% Natriumnitritlösung. Nach dem Trocknen an der Luft besprühten wir die Chromatogramme anschliessend mit n/l Kalilauge. Phenolische Produkte geben dabei gelbe, braune, violette oder schwarze Flecke.

Untersuchung des Säureanteils

In den Säureanteilen der Alkalispaltung von Aglukon A und B kristallisierte aus der methanolischen Lösung eine weisse Substanz in feinen Nadeln aus. Smp. = 184° (Smp. von Anissäure = 184.5°). Ein Mischschmelzpunkt mit authentischer Anissäure gab in beiden Fällen keine Depression. Die mikroanalytischen Bestimmungen stimmten mit den auf Anissäure berechneten Werten gut überein.

97) R.A. EVANS, W.H. PARR, W.C. EVANS, Nature London 164, 674 (1949)

Tabelle 20

CH-Bestimmungen der Säureanteile

	Einwaage mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	% C	% H	Rückstand mg
Aglukon A	1.947	4.22	0.89	gef. 59.15	5.12	0.086
Aglukon B	4.030	7.39	1.92	gef. 50.04	5.33	0.818
Anissäure	-	-	-	ber. 63.16	5.26	-

Tabelle 21

CH₃O-Bestimmungen der Säureanteile

	Einwaage mg	ccm n/50 Na ₂ S ₂ O ₃	% CH ₃ O
Aglukon A	3.782	7.07	gef. 19.35
Aglukon B	3.275	2.88	gef. 9.10
Anissäure	-	-	ber. 20.39

Die UV-Maxima des Säureanteils der Alkalisplaltung von Aglukon A und B stimmten mit denen von authentischer Anissäure überein:

Tabelle 22

UV-Maxima

	1. Max.	2. Max.
Aglukon A	210 mμ	250 mμ
Aglukon B	210 mμ	250 mμ
Anissäure	210 mμ	250 mμ

Alkalischemelze

50 mg Glykosid A versetzten wir mit 2.0 g Kaliumhydroxyd und schmolzen es im Reagenzglas über der Bunsenflamme. Das erkaltete und erstarrte Reaktionsgemisch lösten wir in 10 ml Wasser, säuerten es mit Salzsäure an und schüttelten es mit je 20 ml Äther dreimal aus. Nach dem Abdampfen des Äthers auf dem Wasserbade, lösten wir den Rückstand in Methanol und trugen die Lösung auf ein

Chromatogramm auf, das wir im Laufmittel IAW entwickelten. Das getrocknete Chromatogramm besprühten wir in oben beschriebener Art mit diazotierter Sulfanilsäure. Es trat ein orangeroter Fleck auf, den wir auf Grund seines R_f -Wertes und der Färbung der p-Hydroxy-Benzoesäure zuordnen konnten.

4. Physikalische Untersuchungen

a) UV-Spektroskopie

Wir lösten je 1 mg Substanz, genau gewogen, in 100 ml Methanol p.a. und massen die Lösungen in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit dem Zeiss Opton Spektrophotometer M 4 Q.

Die Messungen der Verschiebungen nach Zugabe von Natriumazetat, Borsäure und Aluminiumchlorid führten wir in der Weise durch, wie es schon in mehreren Arbeiten aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre in München beschrieben wurde^{98,99}.

Die Daten der Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen zeichnen wir als Messkurve auf. Die dabei auftretenden Maxima haben wir in folgenden Tabellen zusammengestellt. (Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25 und Tab. 26)

Tabelle 23
UV-Maxima von Glykosid A

	1. Max. m μ	2. Max. m μ	Verschiebung	
			1. Max. m μ	2. Max. m μ
unbehandelt	275	330	-	-
Natriumazetat	285	315	+10	-15
Na. Azet. Borsäure	275	330	-	-
Aluminiumchlorid	295	350	+20	+20
Al. chlorid Na. azet.	295	335	+20	+5

98) L. STICH, Dissertation München November 1958

99) H. GRASMAIER, Dissertation München Juli 1959

Tabelle 24

UV-Maxima von Aglukon A

	Verschiebung			
	1. Max. m μ	2. Max. m μ	1. Max. m μ	2. Max. m μ
unbehandelt	275	335	-	-
Natriumazetat	275	355	-	+20
Na, azet./Borsäure	275	330	-	-5
Aluminiumchlorid	300	360	+25	+25
Al. chlorid/Na, azet.	295	345	+20	+10

Tabelle 25

UV-Maxima von Glykosid B

	Verschiebung			
	1. Max. m μ	2. Max. m μ	1. Max. m μ	2. Max. m μ
unbehandelt	270	330	-	-
Natriumazetat	270	325	-	-5
Na, azetat/Borsäure	270	325	-	-5
Aluminiumchlorid	275	350	+5	+20
Al. chlorid/Na, azet.	290	330	+20	-

Tabelle 26

UV-Maxima von Aglukon B

	Verschiebung			
	1. Max. m μ	2. Max. m μ	1. Max. m μ	2. Max. m μ
unbehandelt	270	330	-	-
Natriumazetat	275	350	+5	+20
Na, Azet./Borsäure	270	330	-	-
Aluminiumchlorid	280	345	+10	+15
Al. chlorid/Na, azet.	290	330	+20	-

b) IR-Spektroskopie

Die genau gewogenen Glykoside und Aglukone wurden mit Kaliumbromid gemischt und in Form von Presslingen im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 spektroskopiert *).

Im einzelnen wurden folgende Messungen vorgenommen:

Tabelle 27

Einwaagen zur Messung der IR-Spektren

Glykosid A	900 μ / 300 mg KBr
Glykosid B	1037 μ / 300 mg KBr
Glykosid C	1830 μ / 300 mg KBr
Pectolinarin	810 μ / 300 mg KBr
Linarin	100 μ / Spaltmessung
Aglukon A	840 μ / 300 mg KBr
Aglukon B	470 μ / 300 mg KBr
Aglukon C	730 μ / 300 mg KBr
Pectolinarigenin	750 μ / 300 mg KBr
Linarigenin	170 μ / Spaltmessung

*) Herrn Dr. W. Steidle, Mitarbeiter der Firma Dr. K. Thomae, Biberach, danken wir für die Anfertigung dieser IR-Spektren.

Lebenslauf

Am 17. Mai 1931 wurde ich, Werner Kirchner, als Sohn des Stadtbaumeisters Emil Kirchner und seiner Ehefrau Gertrud geb. Keil in Stuttgart geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule trat ich 1942 in die Karls-Oberschule in Stuttgart ein, wo ich 1951 die Reifeprüfung ablegte. Von 1951 bis 1953 war ich Praktikant in der Müller'schen Apotheke in Spaichingen Kreis Tuttlingen.

Die Pharmazeutische Vorprüfung legte ich im Herbst 1953 in Stuttgart ab und begann im Wintersemester 1953 mit dem Studium der Pharmazie an der Universität in Tübingen. Im Sommer- und Wintersemester 1955 studierte ich als Austauschstudent an der Freien Universität in Berlin. Am 15. November 1956 legte ich dort die Pharmazeutische Prüfung ab.

Vom Frühjahr 1957 bis zum Herbst war ich in mehreren Apotheken Württembergs als Kandidat der Pharmazie tätig. Die Bestallung als Apotheker erhielt ich am 1. Januar 1958.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit der Ausarbeitung vorliegender Arbeit.

